
Regulation der B-Zell-Differenzierung anhand posttranskriptionaler Modifikationen von Ebf1 und Untersuchungen zur Redundanz von Ebf-Proteinen

Inga Ludenberg

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

vorgelegt von
Inga Ludenberg
aus Hamburg

angefertigt am Helmholtz Zentrum für Gesundheit und Umwelt
München

München, den 30. November 2011

Erstgutachter: Herr PD Dr. Daniel Krappmann

Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 07. September 2012

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| ZUSAMMENFASSUNG | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 3 |
| ABKÜRZUNGEN | 6 |
| 1. EINLEITUNG | 11 |
| 1.1 DIE ENTWICKLUNG VON HÄMATOPOIETISCHEN STAMMZELLEN WÄHREND DER EMBRYOGENESE | 11 |
| 1.2 DIE B-ZELL-DIFFERENZIERUNG | 12 |
| 1.2.1 <i>Die Entstehung von B-Zellen</i> | 12 |
| 1.2.2 <i>Die Regulation der frühen B-Zell-Differenzierung.....</i> | 15 |
| 1.2.2.1 Verschiedene essentielle Transkriptionsfaktoren steuern den Ablauf der frühen B-Zell-Differenzierung..... | 15 |
| 1.2.2.2 Die frühe B-Zell-Differenzierung wird durch ein komplexes Netzwerk essentieller Transkriptionsfaktoren reguliert | 20 |
| 1.2.2.3 Die Rolle IL-7-vermittelter Signalübertragung für die frühe B-Zell-Differenzierung..... | 23 |
| 1.3 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN..... | 25 |
| 1.3.1 <i>Phosphorylierungen.....</i> | 26 |
| 1.3.2 <i>Posttransationale Modifikationen des Ebf1</i> | 27 |
| 1.4 DIE EBF-PROTEINFAMILIE | 30 |
| 1.4.1 <i>Ebf-Proteine sind untereinander und evolutionär hoch konserviert</i> | 30 |
| 1.4.2 <i>Ebf1</i> | 32 |
| 1.4.3 <i>Ebf2</i> | 32 |
| 1.4.4 <i>Ebf3</i> | 33 |
| 1.4.5 <i>Ebf4</i> | 34 |
| 1.4.6 <i>Proteine der Ebf-Familie scheinen redundante, aber auch spezifische Funktionen ausüben zu können</i> | 34 |
| 1.5 ZIELSETZUNG | 37 |
| 2. MATERIAL UND METHODEN..... | 38 |
| 2.1 MATERIAL | 38 |
| 2.1.1 <i>Geräte</i> | 38 |
| 2.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i> | 39 |
| 2.1.3 <i>Chemikalien, Enzyme und Inhibitoren</i> | 40 |

| | |
|---|----|
| 2.1.4 Kits | 42 |
| 2.1.5 Längenstandards..... | 42 |
| 2.1.6 Antikörper..... | 43 |
| 2.1.6.1 Synthetisches Peptid zur Erzeugung von anti-Ebf1-Y(p)412-Antikörpern..... | 43 |
| 2.1.6.2 Antikörper für Western Blot-Analysen..... | 43 |
| 2.1.6.3 Antikörper für Durchflusszytometrie und Zellsortierung..... | 44 |
| 2.1.6.4 Antikörper für intrazelluläre Durchflusszytometrie..... | 45 |
| 2.1.7 Oligonukleotide..... | 45 |
| 2.1.7.1 Oligonukleotide für quantitative PCR-Reaktionen..... | 45 |
| 2.1.7.2 Oligonukleotide für Maus-Genotypisierungen..... | 46 |
| 2.1.7.3 Oligonukleotide für die punktgerichtete Mutagenese..... | 46 |
| 2.1.7.4 Oligonukleotide für Gelretardierungen..... | 46 |
| 2.1.8 Plasmide | 47 |
| 2.1.9 Bakterien | 48 |
| 2.1.10 Zelllinien..... | 48 |
| 2.1.11 Mausstämme..... | 49 |
| 2.1.12 Software..... | 50 |
| 2.2 METHODEN | 51 |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden | 51 |
| 2.2.1.1 RNA-präparative Techniken | 51 |
| 2.2.1.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen | 51 |
| 2.2.1.1.2 cDNA-Erststrang-Synthese mittels reverser Transkription | 51 |
| 2.2.1.1.3 Quantitative Realtime-PCR | 52 |
| 2.2.1.2 DNA-präparative Techniken | 53 |
| 2.2.1.2.1 Plasmid-Isolierung aus Bakterien | 53 |
| 2.2.1.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanzzellen | 53 |
| 2.2.1.2.3 Maus-Genotypisierung | 53 |
| 2.2.1.2.4 Punktgerichtete Mutagenese | 54 |
| 2.2.1.3 Protein-präparative Techniken | 54 |
| 2.2.1.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen für Western Blot-Analysen | 54 |
| 2.2.1.3.2 Extraktion zytoplasmatischer und nuklearer Fraktionen aus HEK293T-Zellen .. | 55 |
| 2.2.1.3.3 Proteinextraktion aus Ba/F3-Zellen für Luziferase-Reporter-Assays | 55 |
| 2.2.1.3.4 <i>In vitro</i> -Translation von Proteinen | 55 |
| 2.2.1.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Messung | 56 |
| 2.2.1.3.6 Phosphatase-Behandlung von Proteinextrakten | 56 |
| 2.2.1.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen nach Lämmli | 56 |

| | |
|---|----|
| 2.2.1.3.8 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot nach Towbin <i>et al.</i> , 1979) | 57 |
| 2.2.1.3.9 Immundetektion von Proteinen | 57 |
| 2.2.2 Biochemische Methoden..... | 58 |
| 2.2.2.1 Gelretardierung..... | 58 |
| 2.2.2.1.1 Anlagerung des Oligonukleotids | 58 |
| 2.2.2.1.2 Radioaktive Markierung des Oligonukleotids | 58 |
| 2.2.2.1.3 Bindereaktion von Proteinen an die radioaktiv markierten Oligonukleotide | 59 |
| 2.2.2.1.4 Gellauf..... | 59 |
| 2.2.2.2 Luziferase-Reporter-Assay..... | 60 |
| 2.2.2.2.1 Luziferase-Messung | 60 |
| 2.2.2.2.2 β -Galaktosidase-Messung..... | 60 |
| 2.2.3 Zellkultur..... | 60 |
| 2.2.3.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken..... | 60 |
| 2.2.3.2 Kulturmedien für Zelllinien..... | 61 |
| 2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl..... | 62 |
| 2.2.3.4 Ablösen adhärenter Zellen..... | 62 |
| 2.2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen | 62 |
| 2.2.3.6 IL-7-Stimulation muriner B-Zelllinien | 62 |
| 2.2.3.7 Behandlung muriner B-Zelllinien mit Kinase-Inhibitoren | 63 |
| 2.2.3.8 Transiente Transfektion von Säugerzellen | 63 |
| 2.2.3.8.1 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mittels PEI | 63 |
| 2.2.3.8.2 Transiente Transfektion von Ba/F3-Zellen mittels Elektroporation | 64 |
| 2.2.3.9 Herstellung von Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen und retrovirale Transduktion muriner Zellen | 64 |
| 2.2.3.9.1 Herstellung von Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen | 64 |
| 2.2.3.9.2 Retrovirale Transduktion muriner Zellen | 65 |
| 2.2.4 Mausanalysen..... | 65 |
| 2.2.4.1 Mauskreuzungen | 65 |
| 2.2.4.2 Isolierung von Organen und Zellen aus der Maus | 65 |
| 2.2.4.2.1 Isolierung fötaler Leberzellen aus Mausembryonen | 65 |
| 2.2.4.2.2 Isolierung von murinen Knochenmarks- und Milzzellen | 66 |
| 2.2.4.2.3 Herstellung von Whitlock-Witte-Kulturen aus murinen Knochenmarkszellen und Kokultivierung mit transduzierten fötalen Leberzellen (<i>in vitro</i> -B-Zell-Differenzierung).. | 66 |
| 2.2.4.3 Hämatopoietische Rekonstitution von CD45.1-Mäusen | 67 |
| 2.2.4.3.1 Bestrahlung von CD45.1-Mäusen und intravenöse Injektion transduzierter fötaler Leberzellen | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.4.3.2 Analyse rekonstituierter Mäuse | 67 |
| 2.2.5 Durchflusszytometrie und Zellsortierung..... | 68 |
| 2.2.5.1 Durchflusszytometrie..... | 68 |
| 2.2.5.2 Intrazelluläre Durchflusszytometrie..... | 68 |
| 2.2.5.3 Zellsortierung | 69 |
| 2.2.5.3.1 Isolierung von Hardy-B-Zell-Fraktionen | 69 |
| 2.2.5.3.2 Anreicherung GFP-positiver Zellen zur Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen | 69 |
| 2.2.6 Statistik..... | 70 |
| 3. ERGEBNISSE | 71 |
| 3.1. REGULATION DER B-ZELL-DIFFERENZIERUNG ANHAND POSTTRANSLATIONALER MODIFIKATIONEN VON EBF1 | 71 |
| 3.1.1. Verifizierung der <i>Ebf1-Y412-Phosphorylierung</i> | 71 |
| 3.1.1.1 Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung in HEK293T- und 18-81-Zellen mittels eines neu generierten Ebf1-Y(p)412-spezifischen Antikörpers | 71 |
| 3.1.1.2 Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers | 75 |
| 3.1.2 <i>Ebf1-Y412 ist innerhalb der murinen Ebf-Proteinfamilie sowie in verschiedenen Spezies konserviert</i> | 76 |
| 3.1.3 Analyse des <i>Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstatus während der murinen B-Zell-Differenzierung</i> | 77 |
| 3.1.3.1 Die Ebf1-Y412-Phosphorylierung konnte in Gesamt-Knochenmarkszellen, jedoch kaum in Gesamt-Milzzellen detektiert werden | 77 |
| 3.1.3.2 Die Ebf1-Y412-Phosphorylierung konnte in den Hardy-B-Zell-Fraktionen A-E aus dem Knochenmark und der Milz detektiert werden | 79 |
| 3.1.4 Analysen zur biologischen Funktion der <i>Ebf1-Y412-Phosphorylierung in der B-Zell-Differenzierung</i> | 83 |
| 3.1.4.1 Generierung der nicht phosphorylierbaren Mutante Ebf1-Y412F und Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen..... | 83 |
| 3.1.4.2 <i>Ebf1-Y412F-transduzierte fötale Leberzellen aus Ebf1-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der in vitro-B-Zell-Differenzierung</i> | 86 |
| 3.1.4.3 <i>Ebf1-Y412F-transduzierte fötale Leberzellen aus Ebf1-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der in vivo-B-Zell-Differenzierung</i> | 90 |
| 3.1.5 Analysen zur biochemischen Funktion der <i>Ebf1-Y412-Phosphorylierung</i> | 92 |
| 3.1.5.1 Ebf1-Y412F ist im Nukleus von HEK293T-Zellen lokalisiert | 92 |
| 3.1.5.2 Ebf1-Y412F bindet an die Ebf1-Bindestelle des <i>Mb-1-Promotors</i> | 93 |

| | |
|--|-----|
| 3.1.5.3 Die Fähigkeit zur Ebf1-induzierten Transaktivierung des <i>Lambda5</i> -Promotors wird durch Modifikationen der Aminosäure Y412 beeinflusst..... | 95 |
| 3.1.5.4 Reduzierte Transaktivierung der Ebf1-Zielgene <i>VpreB</i> und <i>Mb-1</i> durch Ebf1-Y412F in Ba/F3-Zellen..... | 97 |
| 3.1.6 <i>Analysen zur Regulierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung während der B-Zell-Differenzierung</i> | 98 |
| 3.1.6.1 Der Anteil von phosphoryliertem Ebf1-Y412 an der Gesamt-Ebf1-Menge variiert zwischen verschiedenen B-Zelllinien..... | 98 |
| 3.1.6.2 Die Kinaseaktivität der Bruton-Tyrosinkinase (Btk) hat keinen Einfluss auf die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge | 100 |
| 3.1.6.3 Eine exogene IL-7-Stimulation resultierte in einer erhöhten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3- und 70Z/3-Zellen | 102 |
| 3.1.6.4 Die Inhibition von Jak-Kinasen resultierte in einer verminderten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3-Zellen..... | 104 |
| 3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR REDUNDANZ VON EBF-PROTEINEN..... | 106 |
| 3.2.1 <i>Analysen zur potentiell redundanten Wirkungsweise von Ebf-Proteinen in der B-Zell-Differenzierung</i> | 106 |
| 3.2.1.1 Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen..... | 106 |
| 3.2.1.2 <i>Ebf2-, Ebf3- und Ebf4-transduzierte fötale Leberzellen aus Ebf1-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der in vitro-B-Zell-Differenzierung</i> | 108 |
| 3.2.2 <i>Analysen zur Transaktivierung B-Zell-spezifischer Gene durch die Ebf-Proteine</i> | 111 |
| 3.2.2.1 Ebf2, Ebf3 und Ebf4 transaktivieren den <i>Lambda5</i> -Promotor in Ba/F3-Zellen | 111 |
| 3.2.2.2 Proteine der Ebf-Familie zeigten ein unterschiedliches Potential zur Transaktivierung von <i>VpreB</i> und <i>Mb-1</i> in Ba/F3-Zellen | 113 |
| 4. DISKUSSION..... | 115 |
| 4.1 REGULATION DER B-ZELL-DIFFERENZIERUNG ANHAND POSTTRANSLATIONALER MODIFIKATIONEN VON EBF1 | 115 |
| 4.1.1 <i>Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung</i> | 115 |
| 4.1.2 <i>Der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstatus während der B-Zell-Differenzierung</i> | 117 |
| 4.1.3 <i>Die biologische Funktion der Ebf1-Y412-Phosphorylierung für die B-Zell-Differenzierung</i> | 118 |
| 4.1.4 <i>Die Regulation der Ebf1-Y412-Phosphorylierung während der B-Zell-Differenzierung</i> .. | 122 |
| 4.1.5 <i>Die Relevanz der Ebf1-Y412-Phosphorylierung für die Ebf1-induzierte Zielgen-Expression</i> | 125 |
| 4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR REDUNDANZ VON EBF-PROTEINEN..... | 128 |
| 4.2.1 <i>Stellt die B-Zell-Differenzierung ein geeignetes System für Analysen potentiell redundanter Wirkungsweisen der Ebf-Proteine dar?</i> | 128 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.2 <i>Ebf2-, Ebf3- und Ebf4-transduzierte fötale Leberzellen zeigen einen Defekt in der in vitro-B-Zell-Differenzierung</i> | 129 |
| REFERENZEN..... | 133 |
| DANKSAGUNG | 160 |
| LEBENSLAUF | 162 |
| EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG..... | 164 |
| ERKLÄRUNG | 164 |

Zusammenfassung

Die frühe B-Zell-Differenzierung wird durch ein Netzwerk diverser Transkriptionsfaktoren reguliert, in welchem der *Early B cell factor 1* (*Ebf1*) eine zentrale Funktion ausübt. Bislang wurden jedoch weder interagierende Proteine noch posttranskriptionale Modifikationen für *Ebf1* beschrieben. Kürzlich konnte in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe die Phosphorylierungsstelle *Ebf1*-Y412 identifiziert werden. Da Phosphorylierungen an der Regulation von *Ebf1* beteiligt sein könnten, wurde die *Ebf1*-Y412-Phosphorylierung in der vorliegenden Arbeit weitergehend bestätigt und hinsichtlich ihrer Funktion sowie Regulierung während der B-Zell-Differenzierung charakterisiert. Korrelierend mit einer präferentiell in frühen B-Zellstadien detektierten *Ebf1*-Y412-Phosphorylierung konnte deren Relevanz für die Entwicklung früher B-Zellen gezeigt werden. So wurde die im Prä-Pro-B-Zellstadium arretierte B-Zell-Differenzierung in *Ebf1*-defizienten hämatopoietischen Zellen durch die ektopische Expression der nicht phosphorylierbaren Mutante *Ebf1*-Y412F sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nur partiell wiederhergestellt. Eine Fraktion *Ebf1*-Y412F-transduzierter Zellen konnte hierbei zwar in Pro-B-Zellen differenzieren, das B-Zell-Differenzierungs-Potential gegenüber Wildtyp (wt)-*Ebf1*-transduzierten Zellen war jedoch drastisch reduziert. Dieser Defekt in der B-Zell-Differenzierung könnte in dem scheinbar reduzierten Transaktivierungspotential von *Ebf1*-Y412F begründet sein, während dessen subzelluläre Lokalisation sowie DNA-Bindeaktivität dem wt-*Ebf1* vergleichbar war. Der *Ebf1*-Y412-Phosphorylierungsstatus sowie der Defekt in der frühen B-Zell-Differenzierung *Ebf1*-Y412F-transduzierter Zellen deuten auf eine Regulation dieser Phosphorylierung durch die IL-7-vermittelte Signalübertragung hin. Entsprechend dieser Vermutung wurde die *Ebf1*-Y412-Phosphorylierungsmenge in murinen B-Zelllinien durch eine Stimulation bzw. Inhibition der IL-7-vermittelten Signalübertragung beeinflusst. Somit scheint die essentielle Funktion von *Ebf1* in der B-Zell-Differenzierung durch eine differentielle Regulation der *Ebf1*-Y412-Phosphorylierung gesteuert zu werden.

Die Ebf-Familie umfasst in *Mus musculus* insgesamt vier Transkriptionsfaktoren (*Ebf1-4*), für die aufgrund ihrer hohen Homologie sowie oftmals überlappenden Expression redundante Funktionen vermutet werden. Da in B-Zellen lediglich *Ebf1* exprimiert wird, eignen sich diese Zellen, um potentiell redundante Wirkungsweisen der Ebf-Proteine zu analysieren. So konnte im zweiten Teil dieser Arbeit durch ektopische Expression von *Ebf2*, *Ebf3* oder *Ebf4* in *Ebf1*-defizienten hämatopoietischen Zellen gezeigt werden, dass keines dieser Ebf-Proteine die Funktion von *Ebf1* in der B-Zell-Differenzierung übernehmen kann. Dies könnte in einer differentiellen Transaktivierung B-Zell-spezifischer Gene durch die Ebf-Proteine begründet sein. Somit scheinen die Ebf-Proteine nicht generell redundant zu sein, sondern vermutlich Gewebe- bzw. Zelltyp-abhängig redundante oder spezifische Funktionen auszuüben.

Abstract

The differentiation of early B lymphocytes is dependent on the coordinated actions of signaling cascades and transcriptional networks. Since the transcription factor *Early B cell factor 1* (Ebf1) plays a pivotal role in this process, much work has focused on characterizing Ebf1, but only recently posttranslational modifications of Ebf1 could be identified by our group, amongst others the phosphorylation site Ebf1-Y412. Since phosphorylations may participate in regulation of Ebf1 during B cell development, aim of this thesis was to further confirm the Ebf1-Y412 phosphorylation and characterize their functional properties as well as their regulation during B cell development. Correlating with the phosphorylation of Ebf1-Y412 preferentially detected in early B cell stages, their functional relevance for development of early B cells could be demonstrated by ectopic expression of the nonphosphorylatable transcription factor Ebf1-Y412F in *Ebf1*-deficient hematopoietic cells. The block in B cell development at the pre-pro-B cell stage in *Ebf1*-deficient cells could be overcome by ectopic wildtype *Ebf1* expression. However, only a fraction of *Ebf1*-Y412F transduced cells showed the ability to differentiate into pro-B cells, demonstrating a defect in B cell differentiation of these cells *in vitro* and *in vivo*. This defect may be due to a reduced ability of the mutated transcription factor to transactivate B cell-specific genes, whereas the subcellular localisation and DNA binding activity of Ebf1-Y412F were comparable to Ebf1. The phosphorylation pattern of Ebf1-Y412 together with the observed defect in early B cell development of *Ebf1*-Y412F transduced cells indicate a regulation of Ebf1-Y412 phosphorylation by IL-7 signaling. Accordingly the phosphorylation level in murine B cell lines was affected by stimulating or inhibiting IL-7 signaling. Altogether the essential function of Ebf1 in B cell development seems to be controlled by differential regulation of Ebf1-Y412 phosphorylation. Although Ebf1 was the first Ebf protein described, subsequently additional family members (Ebf2-4) with a high degree of sequence similarity were identified in mice. Several investigations suggest a functional redundancy of Ebf proteins, but those analyses are often hampered by an overlapping expression of Ebf proteins in several tissues. In B cells on the contrary *Ebf1* is the only Ebf family member expressed, making this system a useful tool to study putative redundant functions of Ebf proteins in promoting B cell differentiation. Thereby a defect in B cell development in *Ebf2*-, *Ebf3*- or *Ebf4*-transduced *Ebf1*-deficient haematopoietic cells could be demonstrated, arguing that neither Ebf2, Ebf3 or Ebf4 could take over the function of Ebf1 during B cell development. This defect may be due to a differential transactivation of B cell-specific genes by individual Ebf proteins. Altogether these data demonstrate that Ebf proteins are not functionally redundant in general, but rather could exhibit redundant or specific functions depending on the respective tissue or cell type.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklungsstadien..... | 13 |
| Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Prä-BCR-Komplexes | 14 |
| Abbildung 1.3: Die B-Zell-Differenzierung in <i>PU.1</i> -, <i>IL-7Rα</i> -, <i>E2A</i> -, <i>Ebf1</i> - oder <i>Pax5</i> -defizienten Mäusen ist in verschiedenen Stadien arretiert..... | 16 |
| Abbildung 1.4: <i>Ebf1</i> -defizierte Mäuse zeigen eine im Prä-Pro-B-Zell-Stadium arretierte B-Zell-Differenzierung | 18 |
| Abbildung 1.5: Stark vereinfachte schematische Darstellung des komplexen Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren zur Regulation der frühen B-Zell-Differenzierung | 20 |
| Abbildung 1.6: Vereinfachte schematische Darstellung der Aktivierung des Jak/Stat-Signalwegs nach der Bindung von IL-7 an den IL-7R. | 23 |
| Abbildung 1.7: Identifizierung posttranslationaler Modifikationen des Ebf1 | 29 |
| Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Struktur und Konservierung der Ebf-Proteine Ebf1-4 in <i>M. musculus</i> | 31 |
| | |
| Abbildung 3.1: Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung mittels eines neu generierten Ebf1-Y(p)412-spezifischen Antikörpers..... | 72 |
| Abbildung 3.2: Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers..... | 75 |
| Abbildung 3.3: Ebf1-Y412 ist innerhalb der murinen Ebf-Proteinfamilie sowie in verschiedenen Spezies konserviert | 77 |
| Abbildung 3.4: Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in murinen Gesamt-Knochenmarkszellen und Gesamt-Milzzellen..... | 78 |
| Abbildung 3.5: Hardy-B-Zell-Fraktionierung aus murinen Knochenmarks- und Milzzellsuspensionen | 80 |
| Abbildung 3.6: Die Ebf1-Y412-Phosphorylierung konnte in den Hardy-B-Zell-Faktionen A-E detektiert werden | 81 |
| Abbildung 3.7: Generierung der Ebf1-Mutante Ebf1-Y412F und Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen | 84 |
| Abbildung 3.8: Retrovirale Transduktion <i>Ebf1</i> -defizienter fötaler Leberzellen und Kokultivierung mit Whitlock-Witte-Zellen | 87 |
| Abbildung 3.9: <i>Ebf1</i> -Y412-transduzierte fötale Leberzellen aus <i>Ebf1</i> -defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der <i>in vitro</i> -B-Zell-Differenzierung | 89 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 3.10: <i>Ebf1</i> -Y412-transduzierte fötale Leberzellen aus <i>Ebf1</i> -defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der <i>in vivo</i> -B-Zell-Differenzierung | 91 |
| Abbildung 3.11: Der mutierte Transkriptionsfaktor Ebf1-Y412F ist im Nukleus von HEK293T-Zellen lokalisiert..... | 92 |
| Abbildung 3.12: Ebf1-Y412F bindet an die Ebf1-Bindestelle des <i>Mb-1</i> -Promotors | 94 |
| Abbildung 3.13: Modifikationen der Aminosäure Y412 beeinflussen die Ebf1-induzierte Transaktivierung des <i>Lambda5</i> -Promotors | 96 |
| Abbildung 3.14: Reduzierte Transaktivierung der Ebf1-Zielgene <i>VpreB</i> und <i>Mb-1</i> durch Ebf1-Y412F in Ba/F3-Zellen | 98 |
| Abbildung 3.15: Der Anteil von phosphoryliertem Ebf1-Y412 an der Gesamt-Ebf1-Menge variiert zwischen Ba/F3-, 70Z/3- und 18-81-Zellen | 99 |
| Abbildung 3.16: Die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge wird durch die Kinaseaktivität von Btk nicht beeinflusst..... | 101 |
| Abbildung 3.17: Eine exogene IL-7-Stimulation resultierte in einer erhöhten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3- und 70Z/3-Zellen..... | 103 |
| Abbildung 3.18: Die Inhibition von Jak-Kinasen resultierte in einer verminderten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3-Zellen..... | 105 |
| Abbildung 3.19: Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen..... | 107 |
| Abbildung 3.20: Retrovirale Transduktion <i>Ebf1</i> -defizienter Leberzellen und Kokultivierung mit Whitlock-Witte-Zellen | 109 |
| Abbildung 3.21: <i>Ebf2</i> -, <i>Ebf3</i> - und <i>Ebf4</i> -transduzierte fötale Leberzellen aus <i>Ebf1</i> -defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der <i>in vitro</i> -B-Zell-Differenzierung..... | 110 |
| Abbildung 3.22: Transaktivierung des <i>Lambda5</i> -Promotors durch Ebf2, Ebf3 und Ebf4 in Ba/F3-Zellen..... | 112 |
| Abbildung 3.23: Ebf-Proteine zeigten ein unterschiedliches Potential zur Transaktivierung der B-Zell-spezifischen Gene <i>VpreB</i> und <i>Mb-1</i> | 114 |
| | |
| Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstatus während der B-Zell-Differenzierung, der vorhandenen B-Zell-Stadien in wt- und <i>Ebf1</i> -defizienten Mäusen sowie des B-Zell-Differenzierungs-Potentials <i>Ebf1</i> -Y412F-transduzierter Zellen <i>in vivo</i> | 120 |
| Abbildung 4.2: Mögliches Modell zur potentiellen Phosphorylierung von Ebf1-Y412 durch Jak-Kinasen infolge der IL-7-vermittelten Signalübertragung..... | 124 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 4.3: Generierung von Konstrukten für verschiedene Ebf1/Ebf3-Fusionsproteine..... | 131 |
|---|-----|

Abkürzungen

| | |
|-------------------|--|
| α | anti |
| A | Adenin |
| APC | Allophycocyanin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure(n) |
| ATP | Adenosin-Triphosphat |
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BCR | B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>) |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Rinder-Serum Albumin (<i>Bovine serum albumine</i>) |
| Btk | Bruton-Tyrosinkinase (<i>Bruton's tyrosine kinase</i>) |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| °C | Grad Celsius |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| cDNA | Copy-DNA |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| ChIP | Chromatin-Immunpräzipitation |
| CI | Curie |
| CIP | Kälberdarm-Phosphatase (<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>) |
| CLP | gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>) |
| cm | Zentimeter |
| CMV | <i>Cytomegalovirus</i> |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| d | Tage |
| D | Asparaginsäure |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DBD | DNA-Bindedomäne |
| dCTP | Desoxycytosintriphosphat |
| dd | doppelt destilliert |

Abkürzungen

| | |
|------------------------|--|
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| <i>D. melanogaster</i> | <i>Drosophila melanogaster</i> |
| DMEM | <i>Dulbeccos Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| E | Embryonalstadium |
| Ebf | <i>Early B cell factor</i> |
| ECL | verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>) |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherischia coli</i> |
| EDTA | Ethyldiamintetraacetat |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| <i>et al.</i> | und andere (<i>et alii</i>) |
| F | Phenylalanin |
| FACS | Fluoreszenz-aktivierte Durchfluss-Zytometrie (<i>Fluorescence activated cell sorting</i>) |
| Fc | konstantes Fragment (<i>Fragment crystallizable</i>) |
| FCS | fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>) |
| ff. | folgende |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FP | Vorwärtsprimer (<i>Forward primer</i>) |
| Fr. | Fraktion |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| GFP | Grün-fluoreszierendes Protein (<i>Green fluorescent protein</i>) |
| ggf. | gegebenenfalls |
| x g | x-fache Erdbeschleunigung |
| h | Stunde |
| HCl | Chlorwasserstoff |
| HEK | Humane embryonale Nierenzellen |

Abkürzungen

| | |
|---------------------------------|--|
| | (<i>Human embryonic kidney</i>) |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HLH | <i>Helix Loop Helix</i> |
| Hprt | Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase |
| <i>H. sapiens</i> | <i>Homo sapiens</i> |
| HSC | Hämatopoietische Stammzelle (<i>Hematopoietic stem cell</i>) |
| Ig | Immunglobulin |
| IgH | schwere Immunglobulinkette (<i>Immunoglobulin heavy-chain</i>) |
| IgL | leichte Immunglobulinkette (<i>Immunoglobulin light-chain</i>) |
| IL | Interleukin |
| IP | Immunpräzipitation |
| IPT/TIG | <i>Immunoglobulin-like, plexins, transcription factors/transcription factor immunoglobulin</i> |
| IRES | Interne Ribosomale Eintrittsstelle (<i>Internal ribosomal entry site</i>) |
| Jak | Janus-Tyrosinkinase |
| kb | Kilobase(n) |
| KCl | Kaliumchlorid |
| kDa | Kilodalton |
| <i>LacZ</i> | Gen der β -Galaktosidase |
| LB | Luria Bertani |
| LMPP | lymphoid-geprägte multipotente Vorläuferzelle (<i>lymphoid-primed multipotent progenitor</i>) |
| <i>Luc</i> | <i>Luciferase</i> |
| M | Molar |
| mA | Milliampere |
| μ F | Mikrofaraday |
| mg | Milligramm |
| μ g | Mikrogramm |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |
| Mg ₂ SO ₄ | Magnesiumsulfat |

Abkürzungen

| | |
|--------------------|--|
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| μ l | Mikroliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| μ M | Mikromolar |
| <i>M. musculus</i> | <i>Mus musculus</i> |
| mock | Leervektor-Kontrolle |
| MPP | multipotente Vorläuferzelle (<i>multipotent progenitor</i>) |
| mRNA | Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>) |
| MSCV | <i>Murine stem cell virus</i> |
| n | biologische Replikate |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| <i>Neo</i> | Neomycin |
| ng | Nanogramm |
| nM | nanomolar |
| nm | Nanometer |
| (n.p) | nicht phosphoryliert |
| n.s. | nicht signifikant |
| (p) | phosphoryliert |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| pBS | pBluescript |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PEI | Polyethylenimin |
| perCP | Peridinin-Chlorophyll-Protein |
| PI | Propidium-Iodid |
| pmol | Picomolar |
| Poly(dI-dC) | <i>Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) acid sodium salt</i> |
| Prä-BCR | Prä-B-Zell-Rezeptor (<i>pre-B cell receptor</i>) |
| qRT | quantitative Realtime |

Abkürzungen

| | |
|----------------------|---|
| rad | <i>radiation absorbed dose</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| <i>R. norvegicus</i> | <i>Rattus norvegicus</i> |
| RP | Rückwärtsprimer (<i>Reverse Primer</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| s. | siehe |
| S. | Seite |
| SCF | Stammzellfaktor (<i>Stem cell factor</i>) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>) |
| sec. | Sekunde |
| Stat | Signaltransduktions-aktivierter Transkriptionsfaktor (<i>Signal transducer and activator of transcription</i>) |
| <i>SV40</i> | <i>Simian-Virus 40</i> |
| TAD | Transaktivierungsdomäne |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TBS | Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>) |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| t | Zeit |
| T | Thymin |
| U | <i>Unit</i> |
| u.a. | unter anderem |
| ÜN | über Nacht |
| V | Volt |
| Vol. | Volumen |
| w | Wochen |
| wt | Wildtyp |
| Y | Tyrosin |
| z.B. | zum Beispiel |

1. Einleitung

1.1 Die Entwicklung von hämatopoietischen Stammzellen während der Embryogenese

Hämatopoiese bezeichnet die Entstehung und Entwicklung von Blutzellen. Alle Zellen des hämatopoietischen Systems differenzieren hierbei aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSCs; Spangrude *et al.*, 1988). Eine der wichtigsten Funktion der HSCs ist der lebenslange Erhalt aller Zellen des Blutes. So können HSCs seriell transplantiert werden, ohne ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in alle Zelltypen des hämatopoietischen Systems zu verlieren (Domen & Weissman, 1999; Akashi & Weissman, 2001).

Im sich entwickelnden Mausembryo werden die ersten definierten HCSs im Dottersack, der Plazenta und der Aorta-Gonaden-Mesonephros-Region etwa 9-10 Tage nach der Befruchtung (Embryonalstadium (E) 9-10) gebildet (Huang & Auerbach, 1993; Muller *et al.*, 1994; Godin *et al.*, 1995 & 1999; Cumano *et al.*, 1996; Medvinsky & Dzierzak, 1996; Yoder *et al.*, 1997; de Bruijn *et al.*, 2000). Ab E11 können HSCs hauptsächlich in der fötalen Leber detektiert werden, welche das Hauptorgan der Hämatopoiese während der Embryonalentwicklung darstellt (Ema & Nakauchi, 2000). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Frequenz von HSCs in der fötalen Leber an Tag E14 vergleichbar mit der Frequenz im adulten Knochenmark ist (Rebel *et al.*, 1996b). Zudem zeigen HSCs aus der fötalen Leber ebenfalls die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Rekonstitution aller Zelltypen des hämatopoietischen Systems, wobei fötale HSCs gegenüber adulten HSCs aus dem Knochenmark sogar eine gesteigerte Fähigkeit zur Proliferation aufweisen (Micklem *et al.*, 1972; Fleischman *et al.*, 1982; Capel *et al.*, 1989; Jordan *et al.*, 1990; Rebel *et al.*, 1996a; Harrison *et al.*, 1997).

In der fötalen Leber findet zwischen E11-16 eine starke Expansion der HSCs statt (Morrison *et al.*, 1995; Ema & Nakauchi, 2000; Kumaravelu *et al.*, 2002). Dementsprechend nimmt die Anzahl der myeloiden und B-Zell-Vorläufer in der fötalen Leber zwischen der Mitte der Gestation und der Geburt ebenfalls stetig zu, während die meisten T-Zell-Vorläufer am Tag E13 detektiert werden (Barker *et al.*, 1969; Moore & Metcalf, 1970; Paige *et al.*, 1984; Gunji *et al.*, 1991; Ema *et al.*, 1998). Am Ende der Embryonalentwicklung wandern die HSCs schließlich über das Blut zum Knochenmark (Metcalf & Moore, 1971; Ogawa *et al.*, 1988; Ema & Nakauchi, 2000; Godin & Cumano, 2005).

1.2 Die B-Zell-Differenzierung

1.2.1 Die Entstehung von B-Zellen

Im Embryo findet die B-Zell-Differenzierung in der fötalen Leber statt, während diese nach der Geburt im Knochenmark initiiert wird (Melchers *et al.*, 1975; Melchers, 1977a & 1977b; Paige, 1983; Paige *et al.*, 1984; Hardy & Hayakawa, 1991 & 2001; Cumano *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Yokota *et al.*, 2003).

B-Zellen entstehen wie alle Blutzellen aus HSCs (Spangrude *et al.*, 1988). Zunächst differenzieren HSCs hierbei in multipotente Vorläuferzellen (*multipotent progenitors*, MPPs), welche noch das Potential besitzen, in verschiedene hämatopoietische Zelltypen zu differenzieren (Morrison & Weissman, 1994; Christensen & Weissman, 2001; Singh *et al.*, 2005; Nutt & Kee, 2007). Eine Subpopulation dieser Zellen exprimiert die Rezeptortyrosinkinase *Flk2/Flt3* und kann sowohl in myeloide als auch in lymphoide Zellen differenzieren, jedoch nicht mehr in megakaryozytäre/erythroide Vorläuferzellen. Durch eine gesteigerte *Flt3*-Expression in diesen lymphoid-geprägten multipotenten Vorläufern (*lymphoid-primed multipotent progenitors*, LMPPs), verlieren diese ihr myeloides Differenzierungspotential und werden für die Entwicklung lymphoider Zellen determiniert (Adolfsson *et al.*, 2005; Lai & Kondo, 2006; Yoshida *et al.*, 2006; Mansson *et al.*, 2007). Die LMPP-Population enthält frühe lymphoide Vorläufer (*early lymphoid progenitors*, ELPs), aus welchen sich sowohl frühe T-Zell-Vorläufer (*early T lineage progenitors*, ETPs) als auch gemeinsame lymphoide Vorläufer (*common lymphoid progenitors*, CLPs) entwickeln (Igarashi *et al.*, 2002). Kürzliche Studien zeigten, dass sich das CLP-Kompartiment, definiert anhand der Marker-Kombination $\text{Lin}^- \text{F}\text{lt}3^+ \text{IL-7R}^+ \text{Sca}^{\text{low}} \text{Kit}^{\text{low}}$, aus mindestens drei verschiedenen Subpopulationen zusammensetzt, die sich in ihrem Differenzierungspotential sowie der Expression der Gene *Rag-1*, *Ly6D* und *Lambda5* unterscheiden (Kondo *et al.*, 1997; Karsunky *et al.*, 2008; Mansson *et al.*, 2008 & 2010; Inlay *et al.*, 2009; Tsapogas *et al.*, 2011). Hierbei ist die unreifste Ly6D^- CLP-Fraktion in ihrem Differenzierungspotenzial noch multipotent. Während der Transition dieser Subpopulation in $\text{Ly6D}^+ \text{Rag-1}^+$ -Zellen verlieren diese das Potenzial, sich in natürliche Killerzellen oder dendritische Zellen zu entwickeln. Die Expression von *Lambda5* auf $\text{Ly6D}^+ \text{Rag-1}^+$ -Zellen kennzeichnet schließlich B-Zell-determinierte Vorläuferzellen.

Aus den CLPs entwickeln sich schließlich schrittweise B-Zellen (Shivdasani & Orkin, 1996; Singh *et al.*, 2005). So werden während der B-Zell-Differenzierung verschiedene Stadien durchlaufen, die sich durch die differentielle Expression der Oberflächenantigene *B220*,

CD43, *CD24*, *BP-1*, *IgM* und *IgD*, B-Zell-spezifischer Gene und den *VDJ*-Rekombinationsstatus des Lokus der schweren Immunglobulinkette (*immunoglobulin heavy-chain*, *IgH*) sowie der leichten Immunglobulinkette (*immunoglobulin light-chain*, *IgL*) unterscheiden (Abbildung 1.1). Diese B-Zell-Stadien können durch zwei verschiedene Klassifizierungssysteme beschrieben werden (Osmond *et al.*, 1990, 1992 & 1998; Hardy *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993). Die so genannte Hardy-Nomenklatur unterteilt hierbei die verschiedenen B-Zell-Stadien in sechs Fraktionen (Fr. A-F), während die Osmond-Nomenklatur die B-Zell-Stadien in Prä-Pro-B-, Pro-B-, Prä-B-, unreife B- und reife B-Zellen klassifiziert.

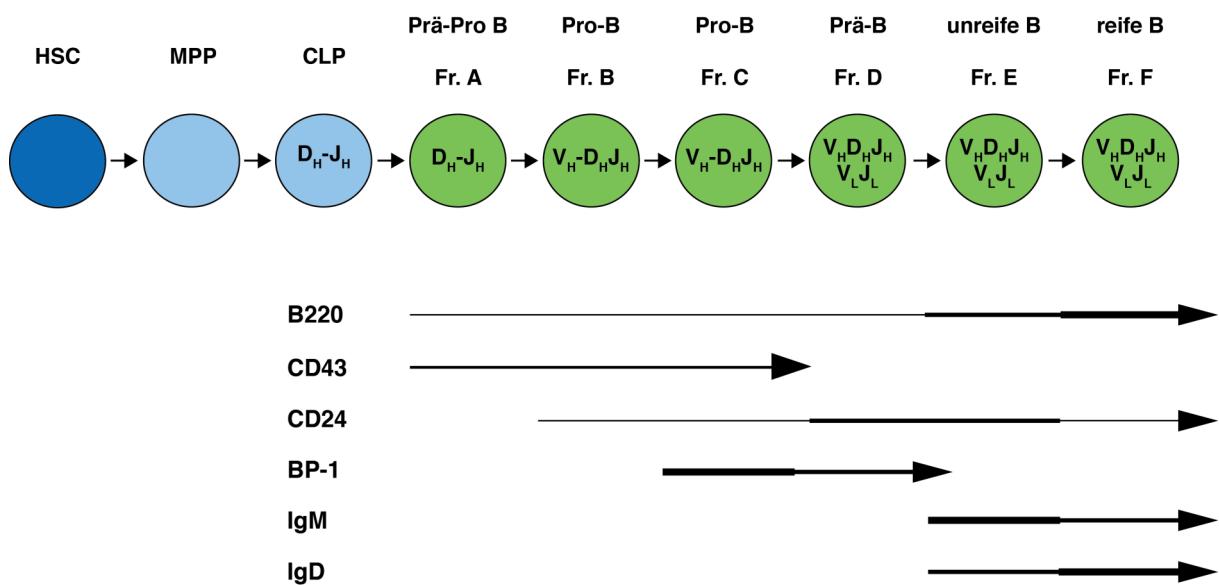


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklungsstadien

Die verschiedenen B-Zell-Fraktionen, klassifiziert durch die Hardy- bzw. die Osmond-Nomenklatur, unterscheiden sich durch die differentielle Expression der Oberflächen-Antigene *B220*, *CD43*, *CD24*, *BP-1*, *IgM* und *IgD* und den *VDJ*-Rekombinationsstatus (nach Hardy *et al.*, 1991; Cancro *et al.*, 2001; Hagman & Lukin, 2005). HSC = hämatopoietische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*); MPP = multipotenter Vorläufer (*multipotent progenitor*); CLP = gemeinsamer lymphoider Vorläufer (*common lymphoid progenitor*), Fr. = Fraktion.

Die Spezifizierung sowie der Erhalt der B-Zell-Identität in der frühen B-Zell-Differenzierung ist hauptsächlich eine Folge der Funktion der Transkriptionsfaktoren E2A, Ebf1 und Pax5 (s. S. 15 ff.). Diese regulieren die Expression B-Zell-spezifischer Gene wie *Mb-1* (*CD79a*), *B29* (*CD79b*), *Lambda5* (*CD179b*) und *VpreB* (*CD179a*), die Komponenten des Prä-B-Zell-Rezeptors (*pre-B cell receptor*, Prä-BCR) kodieren, sowie der Enzyme *Rag-1* und *Rag-2*, welche die somatische Rekombination des *IgH*-Lokus katalysieren (Oettinger *et al.*, 1990; Hardy & Hayakawa, 2001).

Die somatische Rekombination erfolgt in B-Zell-Vorläufern durch Umordnung der *V*-, *D*- und *J*-Gensegmente, welche die variablen Domänen von IgH- und IgL-Ketten kodieren, und dient der Entstehung der Antikörpervielfalt (Tonegawa, 1983; Alt *et al.*, 1986 & 1987). In frühen B-Zellstadien werden zunächst die *V_H*-, *D_H*- und *J_H*-Gensegmente des *IgH*-Lokus verknüpft. Es konnte gezeigt werden, dass bereits in einer Subpopulation der CLPs erste Umlagerungen der Gensegmente durch Verknüpfung von *D_H*- und *J_H*-Segmenten erfolgen (Rumfelt *et al.*, 2006). In Pro-B-Zellen findet schließlich die Verknüpfung von zunächst proximalen und anschließend distalen *V_H*-Segmenten mit *DJ_H* statt (Hesslein & Schatz, 2001; Bassing *et al.*, 2002). Nach einer produktiven *VDJ_H*-Umlagerung des *IgH*-Lokus wird auf Prä-B-Zellen der Prä-BCR exprimiert (Abbildung 1.2). Dieser besteht aus der erfolgreich umgelagerten schweren Kette, einer vorübergehenden leichten Ersatz-Kette, die durch nicht-kovalente Bindung der Proteine Lambda5 und VpreB gebildet wird, sowie den zwei akzessorischen Signal-transduzierenden Ketten Mb-1 (Igα) und B29 (Igβ) (Sakaguchi & Melchers, 1986; Kudo & Melchers, 1987; Pillai & Baltimore, 1987; Kerr *et al.*, 1989; Karasuyama *et al.*, 1990; Tsubata & Reth, 1990; Matsuo *et al.*, 1991; Nishimoto *et al.*, 1991; Brouns *et al.*, 1993; Winkler *et al.*, 1995).

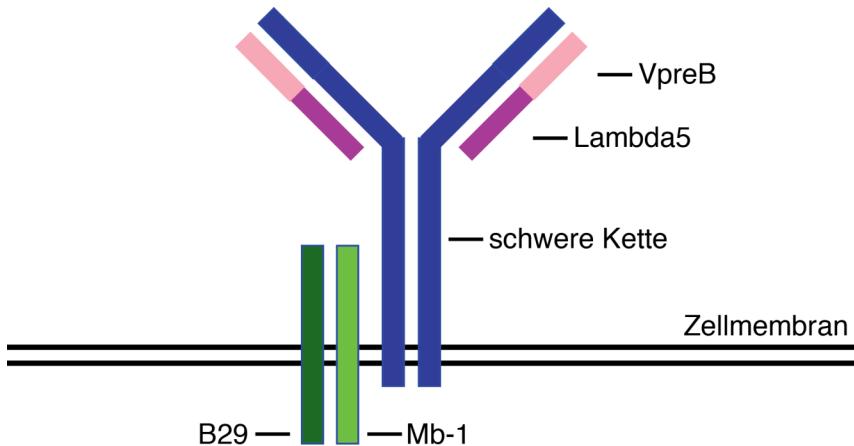


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Prä-BCR-Komplexes

Der Prä-BCR besteht aus einer produktiv umgelagerten schweren Kette, einer leichten Ersatzkette, die durch nicht-kovalente Bindung der Proteine Lambda5 und VpreB gebildet wird, sowie den Signal-transduzierenden Ketten Mb-1 und B29.

Die Ausbildung des Prä-BRCs ist ein entscheidender Kontrollpunkt in der B-Zell-Differenzierung. So sterben Pro-B-Zellen ohne eine produktive *VDJ_H*-Umlagerung des *IgH*-Lokus durch Apoptose (Fang *et al.*, 1996; Lu & Osmond, 1997; Young *et al.*, 1997). Mäusen, denen entweder *Lambda5*, *VpreB*, *Mb-1* oder *B29* fehlen, oder deren Gene für die schwere

Kette so mutiert sind, dass sie keine membran durchspannende schwere Kette produzieren, können keinen Prä-BCR ausbilden und zeigen eine arretierte B-Zell-Differenzierung (Kitamura *et al.*, 1991 & 1992; Ehlich *et al.*, 1993; Rolink *et al.*, 1993b; Gong & Nussenzweig, 1996; Minegishi *et al.*, 1999; Mundt *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2002).

Durch die Signalübertragung des Prä-BCRs wird die Differenzierung der Prä-B- in unreife B-Zellen sowie die Umlagerung der leichten Kette induziert. Diese assoziiert mit der schweren Kette und verdrängt dabei die Ersatzkette, was zur Entstehung eines funktionellen B-Zell-Rezeptors (*B cell receptor*, BCR) auf der Oberfläche der B-Zellen führt (Bossy *et al.*, 1991). Unreife B-Zellen wandern anschließend in die Milz ein, wo die endgültige Differenzierung in reife B-Zellen erfolgt (Allman *et al.*, 1992, 1993, 2001 & 2004). Reife B-Zellen, die noch keinen Antigen-Kontakt hatten, so genannte naive B-Zellen, zirkulieren kontinuierlich im Blutstrom sowie in den sekundären lymphatischen Organen (Thymus, Milz, Lymphknoten, Knochenmark). Nach einem erfolgten Antigen-Kontakt über den B-Zell-Rezeptor sowie kostimulatorischen Signalen durch T-Helferzellen wandern die B-Zellen in die Keimzentren der Milz und der Lymphknoten ein und differenzieren nach starker Proliferation zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen (Ghia *et al.*, 1998; Horowitz *et al.*, 2005).

1.2.2 Die Regulation der frühen B-Zell-Differenzierung

1.2.2.1 Verschiedene essentielle Transkriptionsfaktoren steuern den Ablauf der frühen B-Zell-Differenzierung

Die frühe B-Zell-Differenzierung stellt einen hoch regulierten Prozess dar, in dem durch Aktivierung B-Zell-spezifischer Gene bei gleichzeitiger Inhibition von Genen, welche die Differenzierung in andere Zelltypen fördern, aus CLPs schrittweise B-Zellen entstehen (Shivdasani & Orkin, 1996; Singh *et al.*, 2005). Dieser Prozess wird durch ein komplexes Netzwerk diverser Transkriptionsfaktoren sowie verschiedene Signalwege reguliert (Roessler *et al.*, 2007). So ist in Mäusen mit einer Defizienz für die Transkriptionsfaktoren *PU.1*, *E2A*, *Ebf1* oder *Pax5* sowie für den Zytokin-Rezeptor *IL-7R α* die frühe B-Zell-Differenzierung in verschiedenen Stadien arretiert (Abbildung 1.3; Bain *et al.*, 1994; Peschon *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1994; Zhuang *et al.*, 1994; Lin & Grosschedl, 1995; Mackarehtschian *et al.*, 1995; Nutt *et al.*, 1997; Hagman & Lukin, 2005).

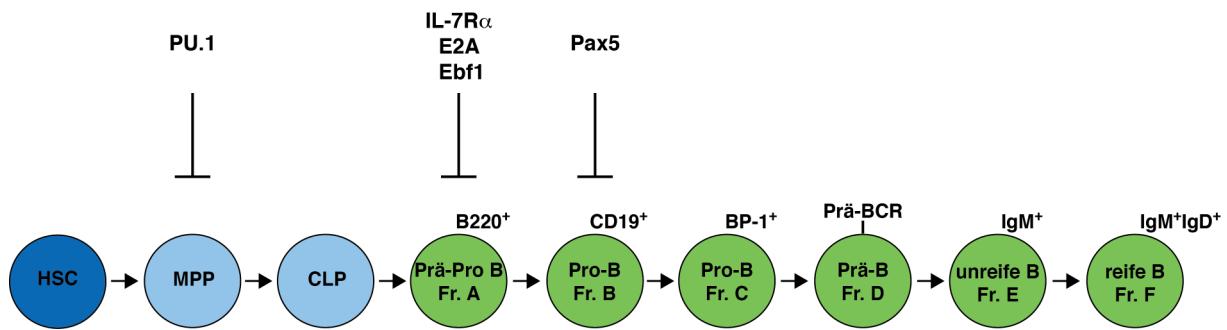


Abbildung 1.3: Die B-Zell-Differenzierung in *PU.1*-, *IL-7R α* -, *E2A*-, *Ebf1*- oder *Pax5*-defizienten Mäusen ist in verschiedenen Stadien arretiert

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der B-Zell-Differenzierung, definiert durch charakteristische Oberflächen-Antigene, ausgehend von HSCs. Die Stadien der in *PU.1*-, *IL-7R α* -, *E2A*-, *Ebf1*- oder *Pax5*-Mäusen arretierten B-Zell-Differenzierung sind angegeben (gesperrte Linien). Modifiziert nach Hagman & Lukin (2005).

Für den Transkriptionsfaktor PU.1 konnte eine regulierende Funktion in der Entwicklung von CLPs demonstriert werden. Während ein hohes Expressionslevel die Differenzierung in myeloide Zellen begünstigt, fördert ein niedriges PU.1-Expressionslevel die B-Zell-Differenzierung (DeKoter & Singh, 2000). Durch die Regulation der Gene *Flt3* und *IL-7R α* übt PU.1 eine entscheidende Funktion in der B-Zell-Differenzierung aus, da für die Zytokin-Rezeptoren *Flk2/Flt3* und *IL-7R α* defiziente Mäuse Defekte sowohl in der fötalen als auch in der adulten B-Zell-Differenzierung zeigen (DeKoter *et al.*, 2002; Sitnicka *et al.*, 2003). *PU.1*-defiziente Mäuse entwickeln weder B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten noch Monozyten, zeigen eine reduzierte Anzahl multipotenter Vorläufer und sterben in der späten Embryonalentwicklung (Scott *et al.*, 1994 & 1997).

Der Transkriptionsfaktor E2A spielt eine bedeutende Rolle in der Spezifizierung lymphatischer Vorläuferzellen in B-Zellen (Bain *et al.*, 1994; Ikawa *et al.*, 2004). In diesen bindet E47, eine Spleißvariante des *E2A*-Gens, als Homodimer an DNA und reguliert zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *Early B cell factor 1* (Ebf1) die B-Zell-spezifischen Gene *Mb-1*, *B29*, *Lambda5*, *VpreB*, *Rag-1* und *Rag-2* (Murre *et al.*, 1989 & 1994; Shen & Kadesch, 1995; Sigvardsson *et al.*, 1997; O'Riordan & Grosschedl, 1999; Roessler *et al.*, 2007). Eine *E2A*-Defizienz in Mäusen führt zu einem Arrest in der B-Zell-Differenzierung im Prä-Pro-B-Zell-Stadium, wobei arretierte Zellen eine stark reduzierte Expression der Gene *Ebf1*, *Pax5*, *Rag-1*, *Mb-1*, *CD19*, *Lambda5* und *B29* zeigen und die Fähigkeit besitzen in multiple Zelltypen zu differenzieren (Bain *et al.*, 1994; Ikawa *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2008). Durch konditionelle Deletion von *E2A* in verschiedenen B-Zell-Stadien konnte inzwischen gezeigt werden, dass E2A nicht nur für die Initiierung der B-Zell-Differenzierung von

Bedeutung ist, sondern ebenfalls für die Entstehung von Pro-, Prä- und unreifen B-Zellen. Hierbei gewährleistet E2A eine kontinuierliche Expression von *Ebf1* und *Pax5* sowie B-Zell-spezifischer Gene (Lazorchak *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2008; Beck *et al.*, 2009).

Eine zentrale Funktion in der frühen B-Zell-Differenzierung wurde für den Transkriptionsfaktor *Ebf1* beschrieben, der neben E2A die Spezifizierung lymphatischer Vorläuferzellen in B-Zellen reguliert. *Ebf1* wurde am Anfang der neunziger Jahre in nukleären Extrakten einer murinen B-Zelllinie als an den *Mb-1*-Promotor gebundenes Protein identifiziert (Hagman *et al.* 1991; Feldhaus *et al.*, 1992). Innerhalb des hämatopoietischen Systems wird *Ebf1* einzig in B-Zellen und deren Vorläufern exprimiert. Eine *Ebf1*-Expression ist hierbei in allen B-Zell-Stadien, mit Ausnahme von Plasmazellen, sowie bereits in CLPs detektierbar, wobei Pro- und Prä-B-Zellen die höchste Expression zeigen (Hagman *et al.*, 1993; Igarashi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Rumfelt *et al.*, 2006; Roessler *et al.*, 2007; Inlay *et al.*, 2009; Mansson *et al.*, 2010; Tsapogas *et al.*, 2011). Während der Embryonalentwicklung wird *Ebf1* ab Tag E14,5 in der fötalen Leber exprimiert und korreliert mit der Expression früher B-Zell-spezifischer Gene wie *IL-7R α* und *Rag-1* (Yokota *et al.*, 2003).

Die essentielle Funktion von *Ebf1* in der B-Zell-Differenzierung konnte durch Analysen *Ebf1*-defizienter Mäuse demonstriert werden, welche ähnlich den *E2A*-defizienten Tieren eine im Prä-Pro-B-Zell-Stadium arretierte B-Zell-Differenzierung aufweisen (Lin & Grosschedl, 1995). Durch Analyse der B220-Expression zeigte sich, dass die Frequenz dieser Prä-Pro-B-Zellen im Knochenmark *Ebf1*-defizienter Mäuse gegenüber Wildtyp (wt)-Tieren bereits stark reduziert ist (Abbildung 1.4; Lin & Grosschedl, 1995). So waren nur etwa 12 % der *Ebf1*-defizienten Gesamt-Knochenmarkszellen B220-positiv, während 67 % der wt-Zellen dieses Oberflächenantigen exprimierten.

Ebf1-heterozygote Mäuse hingegen zeigen gegenüber wt-Mäusen keinen Defekt in der Differenzierung lymphatischer Vorläufer in Prä-Pro-B-Zellen. Die späteren B-Zell-Stadien Fraktion B und C sind jedoch um 50 % und die B-Zellen in der Milz um 10-30 % reduziert, was auf einen Gen-Dosis-Effekt des *Ebf1* hindeutet (Lin & Grosschedl, 1995).

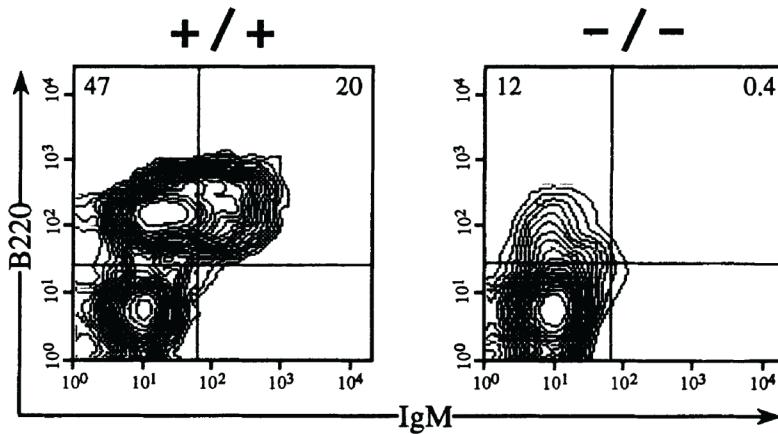


Abbildung 1.4: *Ebf1*-defiziente Mäuse zeigen eine im Prä-Pro-B-Zell-Stadium arretierte B-Zell-Differenzierung

Gezeigt ist eine durchflusszytometrische Analyse von Knochenmarkszellen aus wt- (links) und *Ebf1*^{-/-}-Mäusen (rechts) bezüglich der B220- und IgM-Expression (entnommen aus Lin & Grosschedl, 1995).

In *Ebf1*-defizienten B220-positiven Zellen werden zwar *PU.1*, *IL-7Rα* und *E2A* sowie die Oberflächenantigene *B220* und *CD43* exprimiert, jedoch weisen diese Zellen keine Expression B-Zell-spezifischer Gene wie *Pax5*, *Mb-1*, *B29*, *VpreB*, *Lambda5*, *Rag-1* und *Rag-2* auf und zeigen zudem keine Umordnung der Gensegmente des *IgH*-Lokus (Lin & Grosschedl, 1995). Eine direkte Aktivierung dieser Gene durch *Ebf1* konnte inzwischen gezeigt werden (Hagman *et al.*, 1991; Feldhaus *et al.*, 1992; Lin & Grosschedl, 1995; Sigvardsson *et al.*, 1997; Akerblad *et al.*, 1999; O'Riordan & Grosschedl, 1999, Medina *et al.*, 2004; Zandi *et al.*, 2008). Da diese Gene u.a. Komponenten des Prä-BCRs und des BCRs sowie des VDJ-Rekombinase-Komplexes kodieren (s. 12 ff.) und für *Pax5* eine entscheidende Funktion im Erhalt der B-Zell-Identität beschrieben wurde (s. unten), ist *Ebf1* hiermit von zentraler Funktion in der B-Zell-Differenzierung.

Durch Analysen *Ebf1*-defizienter CLPs konnte in diesen ebenfalls eine reduzierte Expression der Gene *Pax5*, *Mb-1*, *B29*, *VpreB*, *Lambda5*, *Rag-1*, *Rag-2* und *CD19* beobachtet werden, was auf die Funktion von *Ebf1* in der Initiierung des B-Zell-Differenzierungsprogramms bereits im CLP-Stadium hindeutet (Zandi *et al.*, 2008). Übereinstimmend mit dieser Theorie induziert eine ektopische Expression von *Ebf1* in hämatopoietischen Vorläufern die B-Zell-Differenzierung und führt zu einer Wiederherstellung der B-Zell-Differenzierung in *IL-7*-, *PU.1*- oder *E2A*-defizienten Zellen (Zhang *et al.*, 2003; Medina *et al.*, 2004; Seet *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007). Eine Funktion von *Ebf1* in der Initiierung des B-Zell-Differenzierungsprogramms wird weiterhin durch dessen Chromatin-modulierende Funktionen unterstützt (Roessler *et al.*, 2007; Treiber *et al.*, 2010b). So konnte gezeigt

werden, dass Ebf1 eine Demethylierung des *Mb-1*-Promotors und somit die Zugänglichkeit des Chromatins vermitteln kann, wodurch Ebf1 die Voraussetzung für die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren schaffen könnte (Maier *et al.*, 2004).

Zusätzlich zur Aktivierung B-Zell-spezifischer Gene unterdrückt Ebf1 die Differenzierung in andere Zelltypen. So resultiert eine ektopische *Ebf1*-Expression in MPPs in einer Induktion der B-Zell-Differenzierung und in *Pax5*-defizienten Zellen, die eine ungewöhnliche Plastizität aufweisen (s. unten), in einer Inhibition der myeloiden und T-Zell-Differenzierung (Pongubala *et al.*, 2008; Thal *et al.*, 2009). Des Weiteren zeigen *Ebf1*-defizierte CLPs gegenüber wt-CLPs ein drastisch gesteigertes Potential, in natürliche Killerzellen und dendritische Zellen zu differenzieren (Tsapogas *et al.*, 2011). Zudem korreliert die steigende *Ebf1*-Expression während der frühen B-Zell-Differenzierung mit dem zunehmenden Verlust der B-Zell-Vorläufer, in andere Zelltypen zu differenzieren (Rumfelt *et al.*, 2006).

Kürzlich konnten durch Genom-weite „*ChIP-on-Chip*“-Analysen in Kombination mit Funktionsverlust- und Funktionszugewinn-Studien insgesamt 565 Gene identifiziert werden, die in der Proliferation von Zellen, Signalübertragung und wichtigen Kontrollpunkten der B-Zell-Differenzierung involviert sind und *in vivo* durch Ebf1 reguliert werden (Treiber *et al.*, 2010b). Zusätzlich zu *Ebf1*-induzierten bzw. -reprimierten Genen befanden sich hierunter Gene, deren Expression nicht mit der Ebf1-Bindung korrelierte, die jedoch in Folge dieser Bindung in ihrer Chromatinstruktur moduliert wurden. Hierdurch könnte Ebf1 die Voraussetzung für die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren und die Initiierung des B-Zell-Differenzierungsprogramms schaffen.

Während E2A und Ebf1 entscheidend für die Spezifizierung der B-Zell-Differenzierung sind, gewährleistet der Transkriptionsfaktor Pax5 den kontinuierlichen Erhalt der B-Zell-Identität (Nutt *et al.*, 1999). In *Pax5*-defizienten Mäusen ist die B-Zell-Differenzierung im Pro-B-Zell-Stadium arretiert (Urbanek *et al.*, 1994; Nutt *et al.*, 1997). Die vorhandenen Pro-B-Zellen zeigen zwar eine Expression früher B-Zell-spezifischer Gene sowie eine *D_H-J_H*-Umordnung und eine proximale *V_H-D_J_H*-Umordnung des *IgH*-Lokus, weisen jedoch eine ungewöhnliche Plastizität auf. So können *Pax5*-defizierte B-Zellen nach einer Transplantation ebenfalls in T-Zellen, myeloide oder erythroide Zellen differenzieren (Nutt *et al.*, 1999 & 2001). Dementsprechend konnte bereits gezeigt werden, dass Pax5 die Expression von *Notch-1* und somit die T-Zell-Differenzierung sowie verschiedene myeloide Gene, wie z.B. *M-CSFR*, inhibiert (Serwe & Sablitzky, 1993; Nutt *et al.*, 1999; Souabni *et al.*, 2002). Zusätzlich zu der Repression von Genen, welche die Differenzierung in andere Zelltypen fördern, aktiviert Pax5 essentielle B-Zell-spezifische Gene wie z.B. *Mb-1*, *CD19* und *Blnk*, die für

Komponenten des Prä-BCRs, des BRCs sowie des signalübertragenden B-Zell-Korezeptor-Komplexes kodieren (Nutt *et al.*, 2001; Cobaleda *et al.*, 2007). Des Weiteren fördert Pax5 die distale V_H - DJ_H -Umordnung des *IgH*-Lokus (Hesslein *et al.*, 2003).

Die Transkriptionsfaktoren PU.1, E2A, Ebf1 und Pax5 sowie der Zytokin-Rezeptor IL-7R α sind demnach jeweils von essentieller Bedeutung in der frühen B-Zell-Differenzierung. Die vollständige B-Zell-Differenzierung benötigt jedoch das Zusammenwirken dieser Faktoren.

1.2.2.2 Die frühe B-Zell-Differenzierung wird durch ein komplexes Netzwerk essentieller Transkriptionsfaktoren reguliert

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Aktivität der oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren durch eine hierarchische Abfolge koordiniert wird. Durch zahlreiche Studien ist hingegen inzwischen belegt, dass die Transkriptionsfaktoren, welche die frühe B-Zell-Differenzierung steuern, in einem komplexen Netzwerk agieren und durch gegenseitige Wechselwirkungen, Auto-Regulation und Rückkopplungsmechanismen reguliert werden (Abbildung 1.5; Nutt & Kee, 2007; Mandel & Grosschedl, 2010).

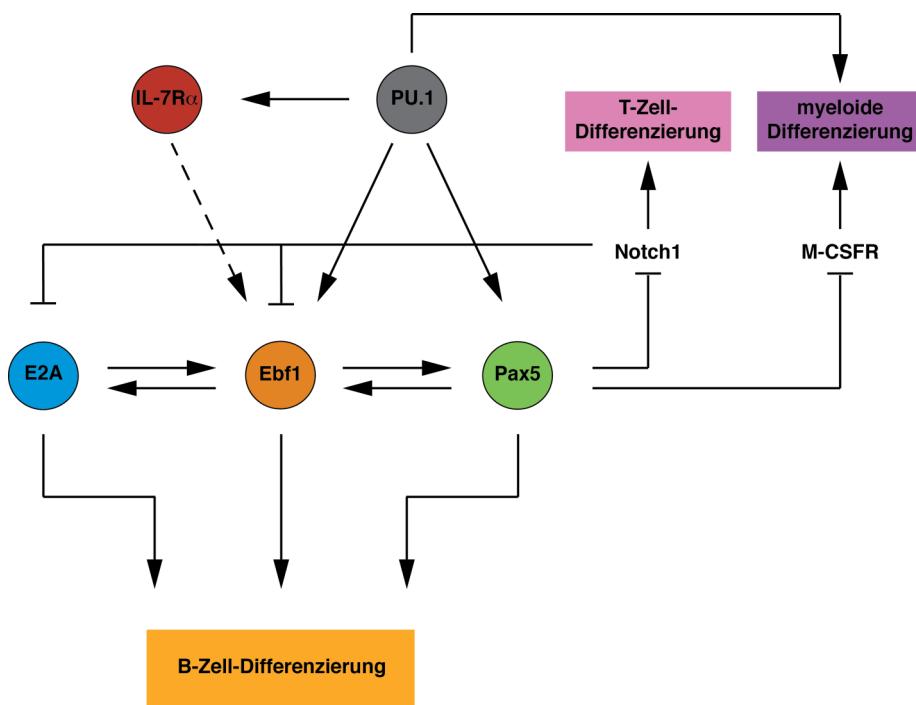


Abbildung 1.5: Stark vereinfachte schematische Darstellung des komplexen Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren zur Regulation der frühen B-Zell-Differenzierung

Gezeigt sind ausgewählte Transkriptionsfaktoren, die essentiell für die Initiierung der B-Zell-Differenzierung bei gleichzeitiger Inhibition der Differenzierung in andere Zelltypen sind. Ein Pfeil stellt eine direkte Aktivierung und ein gestrichelter Pfeil eine indirekte Aktivierung dar, während eine inhibierende Aktivität durch eine gesperrte Linie gekennzeichnet ist (in Anlehnung an Mandel & Grosschedl, 2010).

PU.1-defiziente Mäuse weisen eine reduzierte Anzahl multipotenter Vorläufer auf und entwickeln weder B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten noch Monozyten und zeigen daher von den hier beschriebenen Transkriptionsfaktoren den frühesten Arrest in der B-Zell-Differenzierung (Scott *et al.*, 1994 & 1997). Es konnte gezeigt werden, dass *PU.1* *in vitro* und *in vivo* an eine konservierte Bindestelle im ersten Exon von *Ebf1* bindet und darüber dessen Expression reguliert (Medina *et al.*, 2004; Roessler *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde in *PU.1*-defizienten hämatopoietischen Vorläufern aus der fötalen Leber eine reduzierte *Ebf1*-Expression festgestellt, während eine ektopische *Ebf1*-Expression die B-Zell-Differenzierung in diesen Zellen wiederherstellt (Medina *et al.*, 2004). Daher wird angenommen, dass *Ebf1* von *PU.1* reguliert wird.

Zahlreiche Studien zeigen die funktionelle Relevanz von *Ebf1* und E2A für die Spezifizierung lymphatischer Vorläuferzellen in B-Zellen. Wie bereits beschrieben, führt eine Defizienz für einen der beiden Transkriptionsfaktoren in Mäusen zu einem vergleichbaren Arrest in der B-Zell-Differenzierung im Prä-Pro-B-Zell-Stadium. Ursprüngliche Studien zur Hierarchie dieser beiden Transkriptionsfaktoren in der Regulation der frühen B-Zell-Differenzierung legten nahe, dass E2A die Expression von *Ebf1* aktiviert und dass diese beiden Faktoren synergistisch die Expression B-Zell-spezifischer Gene wie *Pax5*, *Lambda5*, *VpreB* and *Mb-1* induzieren (Sigvardsson *et al.*, 1997; O'Riordan & Grosschedl, 1999; Roessler *et al.*, 2007). So konnte gezeigt werden, dass die Expression von *Ebf1* durch eine ektopische *E2A*-Expression induziert wird und der *Ebf1*-Promotor eine Bindestelle für E2A enthält (Kee & Murre, 1998; Smith *et al.*, 2002; Roessler *et al.*, 2007). E2A-Proteine können in CLPs detektiert werden und in *E2A*-defizienten Mäusen findet keine *Ebf1*-Expression statt, während eine ektopische *Ebf1*-Expression in *E2A*-defizienten hämatopoietischen Vorläufern die B-Zell-Differenzierung wiederherstellt (Bain *et al.*, 1994; Seet *et al.*, 2004; Zhuang *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2008).

Zugleich ist jedoch die *E2A*-Expression in *Ebf1*-defizienten Mäusen reduziert, was auf eine Regulation des *E2A* durch *Ebf1* und somit auf eine gegenseitige Steuerung der beiden Transkriptionsfaktoren hindeutet (Zhuang *et al.*, 2004). Zudem zeigen *Ebf1/E2A*-doppelt-heterozygote Mäuse einen ausgeprägteren Defekt in der B-Zell-Differenzierung als die entsprechenden heterozygoten Mäuse für *Ebf1* oder *E2A* (O'Riordan & Grosschedl, 1999).

Eine gegenseitige Wechselwirkung in der Regulation konnte ebenfalls für *Ebf1* und *Pax5* gezeigt werden. In *Pax5*-defizienten Pro-B-Zellen kann sowohl *Ebf1*- als auch *E2A*-Transkript detektiert werden (O'Riordan & Grosschedl, 1999), während in *Ebf1/E2A*-doppelt-heterozygoten Mäusen die *Pax5*-Expression reduziert ist (O'Riordan & Grosschedl, 1999).

Zudem resultiert eine ektopische Expression von *Ebf1* in *E2A*- oder *PU.1*-defizienten Vorläuferzellen in einer Aktivierung der *Pax5*-Expression (Medina *et al.*, 2004; Seet *et al.*, 2004). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass *Ebf1* sowohl direkt durch Bindung als auch indirekt durch Modulation des Chromatins den *Pax5*-Promotor reguliert (O'Riordan & Grosschedl, 1999; Decker *et al.*, 2009). Des Weiteren wird *Pax5* zusätzlich durch *PU.1* reguliert (Decker *et al.*, 2009). Dies lässt ursprünglich vermuten, dass *Pax5* in der Hierarchie nachgeschaltet von *PU.1*, *Ebf1* und *E2A* agiert.

Hingegen belegen verschiedene Studien ebenfalls eine Regulation von *Ebf1* durch *Pax5*. So ist die *Ebf1*-Expression in *Pax5*-defizienten Pro-B-Zellen reduziert (Fuxa *et al.*, 2004; Roessler *et al.*, 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *Pax5* an verschiedenen Stellen im *Ebf1*-Promotor binden und diesen synergistisch mit dem Transkriptionsfaktor *Ets.1* aktivieren kann (Roessler *et al.*, 2007). Zusätzlich wird über eine indirekte Regulation des *Ebf1* durch *Pax5* spekuliert (Roessler *et al.*, 2007). So ist bereits bekannt, dass *Pax5* inhibierend auf die Expression von *Notch1* wirkt, welches wiederum als Antagonist der *Ebf1*- und *E2A*-Aktivität agiert (Souabni *et al.*, 2002; Nie *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2005).

2007 durchgeführte *Ebf1*-Promotorstudien lieferten zusätzliche Hinweise auf die komplexen Regulationsmechanismen, welche die frühe B-Zell-Differenzierung steuern, sowie auf die zentrale Funktion von *Ebf1* in diesem Prozess (Roessler *et al.*, 2007). *Ebf1* wird demnach durch *E2A*, *Stat5*, *Pax5*, *Ets1* und *PU.1* reguliert und zeigt zudem einen autoregulatorischen Mechanismus, der die *Ebf1*-Expression zusätzlich aktiviert. In B-Zellen konnten zwei Isoformen des *Ebf1*, *Ebf1 α* und *Ebf1 β* , identifiziert werden, die sich in den ersten 14 N-terminalen Aminosäuren unterscheiden. Deren Expression wird durch zwei verschiedene Promotoren gesteuert, die differentiell reguliert werden (Smith *et al.*, 2002; Roessler *et al.*, 2007). Während der distale Promotor *Ebf1 α* (-5113 bis -4027) durch *E2A*, *Ebf1* und *STAT5* gesteuert wird, wird der proximale Promotor *Ebf1 β* (-1671 bis +1) durch *Pax5*, *Ets1* und *PU.1* reguliert. In Abwesenheit von *Pax5* ist die Funktion des proximalen Promoters sowie die Akkumulation von *Ebf1* in der Zelle stark vermindert. Des Weiteren hat die *Pax5*-Defizienz eine verzögerte DNA-Replikation sowie eine alternierte subzelluläre Lokalisation des *Ebf1*-Lokus zur Folge (Roessler *et al.*, 2007).

Die Regulation der *Ebf1*-Expression durch unterschiedliche Promotoren unter Beteiligung mehrerer Transkriptionsfaktoren könnte so der Erzeugung mehrerer Rückkopplungs-Mechanismen und somit der komplexen Koordination und Stabilisierung des frühen B-Zell-Differenzierungs-Programms dienen (Roessler *et al.*, 2007).

1.2.2.3 Die Rolle IL-7-vermittelter Signalübertragung für die frühe B-Zell-Differenzierung

Das Zytokin IL-7 ist von essentieller Bedeutung für die Differenzierung von B- und T-Zellen (Peschon *et al.*, 1994; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995). Dessen heterodimerer Rezeptor (IL-7R) setzt sich aus der alpha-Kette des IL7-R (IL-7R α), über welche die Bindung von IL-7 erfolgt, sowie aus der IL-2R γ -Kette (*common γ -chain*) zusammen (Abbildung 1.6; Leonard *et al.*, 1995; Sugamura *et al.*, 1995; Ohbo *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die IL-7-vermittelte Signalübertragung u.a. den Jak/Stat (Janus-Tyrosinkinase/ *Signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg aktiviert (Lin *et al.*, 1995).

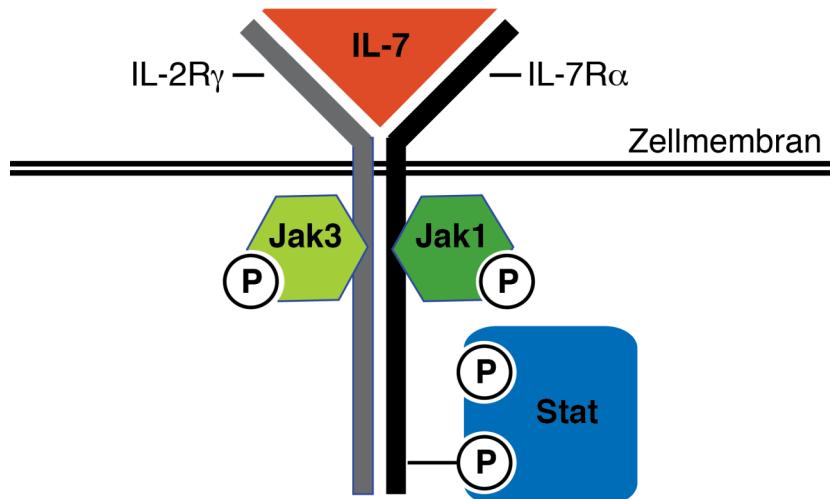


Abbildung 1.6: Vereinfachte schematische Darstellung der Aktivierung des Jak/Stat-Signalwegs nach der Bindung von IL-7 an den IL-7R.

Die IL-7-vermittelte Signalübertragung erfolgt nach der Bindung von IL-7 an den IL-7R durch Transphosphorylierung von Jak1 und Jak3, woraufhin Jak3 Tyrosin-Reste des zytoplasmatischen Teils der α -Kette phosphoryliert. Hierdurch wird die Bindung von Stat-Proteinen ermöglicht, die ihrerseits durch Jak1 und Jak3 phosphoryliert werden.

Die Familie der Jak-Kinasen umfasst in Säugetieren Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 (Darnell *et al.*, 1994; Darnell, 1997). Während *Jak1*, *Jak2* und *Tyk2* ubiquitär exprimiert sind, ist die Expression von *Jak3* auf lymphoide Zellen beschränkt (Johnston *et al.*, 1994; Witthuhn *et al.*, 1994). Für Jak3 konnte eine konstitutive Assoziation mit dem zytoplasmatischen Teil der γ -Kette des IL-7R gezeigt werden, während Jak1 mit der α -Kette assoziiert ist (Boussiotis *et al.*, 1994; Miyazaki *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1994). Nach der IL-7-Bindung erfolgt die Signalübertragung durch die Multimerisierung der Rezeptor-Untereinheiten, wodurch sich Jak1 und Jak3 gegenseitig durch Transphosphorylierung aktivieren können (Boussiotis *et al.*, 1994; Miyazaki *et al.*, 1994; Russell *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 2004). Jak3 phosphoryliert

daraufhin Tyrosin-Reste des zytoplasmatischen Teils der α -Kette, wodurch die Bindung der Stat-Proteine Stat1, Stat3 und Stat5a/b ermöglicht wird (Greenlund *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995; van der Plas *et al.*, 1996; Goetz *et al.*, 2004). Die Stat-Proteine werden ihrerseits durch Jak1 und Jak3 phosphoryliert, woraufhin diese vom IL-7R dissoziieren, als Homo- oder Heterodimere in den Zellkern translozieren und dort als Transkriptionsfaktoren wirken (Darnell *et al.*, 1994; Ihle *et al.*, 1994; Darnell, 1997; Horvath & Darnell, 1997; Leonard & O’Shea, 1998; Leonard & Lin, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass die IL-7-vermittelte Signalübertragung von essentieller Funktion für die B-Zell-Differenzierung ist. So weisen für *IL-7* oder *IL-7R α* defiziente Mäuse einen Defekt in der B-Zell-Differenzierung auf, der dem *Ebf1*-defizienter Mäuse ähnelt (Peschon *et al.*, 1994; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995; Lin & Grosschedl, 1995). So ist im Knochenmark adulter Tiere die B-Zell-Differenzierung im Prä-Pro-B-Zell-Stadium arretiert (Kikuchi *et al.*, 2005). Diese Prä-Pro-B-Zellen zeigen eine Expression von *B220* und *CD43*, weisen jedoch keine Expression charakteristischer B-Zell-Gene auf (Kikuchi *et al.*, 2008).

Der *IL-7R α* wird jedoch bereits in einer Subpopulation der LMPPs sowie in CLPs exprimiert (Kondo *et al.*, 1997; Adolfsson *et al.*, 2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Frequenz an LMPPs und CLPs in *IL-7*-defizienten Mäusen reduziert ist (Tsapogas *et al.*, 2011). Während die vorhandenen LMPPs keine funktionellen Defekte aufweisen, zeigen *IL-7*-defiziente CLPs eine erhöhte Plastizität sowie eine reduzierte Expression B-Zell-spezifischer Gene wie *Ebf1*, *Rag-1*, *Pax5*, *Mb-1* und *Lambda5*. Daher scheint IL-7 bereits für die Initiierung des B-Zell-Differenzierungs-Programms in CLPs von entscheidender Bedeutung zu sein. Da die *Ebf1*-Expression in *IL-7*-defizienten CLPs sowie in Prä-Pro-B-Zellen im Vergleich zu wt-Zellen reduziert ist und *Ebf1* eine essentielle Funktion in der Initiierung der B-Zell-Differenzierung ausübt, könnte *Ebf1* hierbei die IL-7-abhängige Spezifizierung lymphatischer Vorläuferzellen in B-Zellen vermitteln (Dias *et al.*, 2005; Kikuchi *et al.*, 2005 & 2008; Tsapogas *et al.*, 2011). Ein Einfluss IL-7-vermittelter Signalübertragung auf die Expression von *Ebf1* konnte in *Mus musculus* bereits gezeigt werden. So wird *Ebf1* durch den Transkriptionsfaktor Stat5 reguliert, der in der IL-7-vermittelten Signalübertragung eine entscheidende Funktion ausübt (Goetz *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2005; Roessler *et al.*, 2007). Des Weiteren kann das B-Zell-Differenzierungs-Potential in *IL-7*- oder *IL-7R α* -defizienten Zellen teilweise durch eine ektopische *Ebf1*-Expression wiederhergestellt werden (Dias *et al.*, 2005; Kikuchi *et al.*, 2005). Diese Daten lassen daher vermuten, dass die IL-7-vermittelte Signalübertragung von essentieller Bedeutung für die vollständige Induktion der *Ebf1*-Expression und somit die Initiierung des B-Zell-Differenzierungs-Programms ist.

1.3 Posttranskriptionale Modifikationen

Schätzungen zufolge setzt sich das menschliche Genom aus etwa 20.000-25.000 Genen zusammen, während das menschliche Proteom dynamisch ist und aus über einer Million Proteine bestehen könnte (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004; Jensen, 2004). Die Komplexität des Proteoms wird hierbei u.a. durch posttranskriptionale Modifikationen erzielt, welche die Aktivität, Interaktion, Lokalisierung und Stabilität von Proteinen beeinflussen (Jensen, 2004). Es wird vermutet, dass etwa 5 % des Proteoms aus Enzymen, wie z.B. Kinasen, Phosphatasen, Transferasen oder Ligasen, besteht, die mehr als 200 verschiedene Arten posttranskriptionaler Modifikationen katalysieren (Krishna & Wold, 1993; Walsh, 2006).

Bei posttranskriptionalen Modifikationen handelt es sich um chemische Veränderungen der Proteinstruktur, die entweder noch während oder erst nach der Faltung der Polypeptidketten in verschiedenen zellulären Kompartimenten, wie beispielsweise dem Nukleus, Cytoplasma, Endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat, katalysiert werden. Posttranskriptionale Modifikationen können hierbei in Form irreversibler proteolytischer Spaltung oder kovalenter Modifikationen spezifischer Aminosäuren erfolgen (Blom *et al.*, 2004; Jensen, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass nahezu jede der natürlich vorkommenden proteinogenen Aminosäuren durch posttranskriptionale Modifikationen modifiziert werden kann (Garavelli, 2003).

Kovalente Modifikationen umfassen u.a. Phosphorylierungen, Acetylierungen, Glykosylierungen und Methylierungen, wobei bestimmte posttranskriptionale Modifikationen nur an speziellen Aminosäuren stattfinden (Blom *et al.*, 2004). So werden beispielsweise Serine, Threonine und Tyrosine durch Phosphorylierung modifiziert. Da posttranskriptionale Modifikationen jedoch von der Zugänglichkeit der jeweiligen Aminosäure sowie durch umgebende Peptidsequenzen, dem so genannten Akzeptor-Motiv, beeinflusst werden, werden in der Regel nicht sämtliche der jeweiligen in einem Protein vorkommenden Aminosäuren modifiziert (Blom *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2006; Gnad *et al.*, 2007). Zudem kann die Modifikation reversibel sein. Protein-Phosphorylierungen werden beispielsweise durch ein Zusammenspiel von Protein-Kinasen und -Phosphatasen reguliert (Blom *et al.*, 2004).

1.3.1 Phosphorylierungen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen stellt eine ubiquitäre posttranskriptionale Modifikation in Pro- und Eukaryoten dar (Gnad *et al.*, 2007). Hierbei beeinflussen Phosphorylierungen von Serinen, Threoninen und Tyrosinen die Synthese, Stabilität, Lokalisation, Funktion und Interaktion von Proteinen und somit wichtige Regulationsprozesse wie Zellwachstum, -proliferation, -differenzierung und die Immunantwort (Yaffe & Cantley; 1999; Cohen, 2000; Hunter, 2000; Pawson & Nash; 2000; Schlessinger, 2000; Pawson & Scott, 2005; Gnad *et al.*, 2010).

Prokaryoten, in denen viele dieser Regulationsprozesse nicht stattfinden, besitzen mit mehreren Hundert identifizierten Phosphorylierungsstellen ein im Vergleich zu Eukaryoten relativ kleines Phosphoproteom (Gnad *et al.*, 2010). In Eukaryoten hingegen konnten bisher mehrere Tausend Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, von über 3500 in Hefe bis zu mehr als 20.000 im Menschen (Beausoleil *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2006 & 2010; Bodenmiller *et al.*, 2007; Villén *et al.*, 2007; Gnad *et al.*, 2009; Macek *et al.*, 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich viele bekannte humane Kinasen erst entwickelten, nachdem Hefe und Mensch evolutionär divergierten (Manning *et al.*, 2002). Bisherigen Schätzungen zufolge sind, zumindest unter bestimmten Bedingungen, mehr als die Hälfte aller eukaryotischen Proteine phosphoryliert (Olsen *et al.*, 2010).

Pro- und Eukaryoten unterscheiden sich in dem Grad der Konservierung von Phosphoproteinen sowie Phosphorylierungsstellen. Phosphoproteine besitzen innerhalb der Eukaryoten mehr Orthologe als Nicht-Phosphoproteine (Gnad *et al.*, 2010). In höheren Organismen wie Fliege, Maus und Mensch zeigen zudem phosphorylierte Serine, Threonine und Tyrosine eine höhere Konservierung als die entsprechenden nicht phosphorylierten Aminosäuren in ähnlichen Strukturmotiven desselben Proteins (Gnad *et al.*, 2007 & 2010). In Hefe und *Caenorhabditis elegans* sowie in Prokaryoten hingegen findet sich eine weniger starke Konservierung von Phosphorylierungsstellen im Vergleich zu höheren Eukaryoten (Gnad *et al.*, 2010). Für Prokaryoten wurde bereits ein Modell beschrieben, nach dem sich spezifische Phosphorylierungsstellen durch Anpassung der Prokaryoten an die jeweilige ökologische Nische entwickeln (Soufi *et al.*, 2008; Gnad *et al.*, 2010).

Phosphorylierungsstellen sind hauptsächlich in Protein-Regionen mit flexibler Struktur, wie Schleifen oder Gelenkstrukturen, lokalisiert (Dunker *et al.*, 2002; Iakoucheva *et al.*, 2004; Gnad *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2007). So findet man 93 % der phosphorylierten Serine, 88,5 % der phosphorylierten Threonine und 67,3 % der phosphorylierten Tyrosine in solchen Bereichen (Gnad *et al.*, 2007), die tendenziell an der Protein-Oberfläche liegen und für

Protein-Kinasen besser zugänglich sind. Zudem sind Schleifen-Strukturen von Proteinen nachweislich an der Bildung von Bindestellen sowie aktiven Zentren von Enzymen beteiligt und eignen sich daher für Regulierungen in Form posttranskriptionaler Modifikationen (Gnad *et al.*, 2007). Phosphorylierte Serine, Threonine und Tyrosine weisen dementsprechend eine höhere Zugänglichkeit auf als die entsprechenden nicht phosphorylierten Aminosäuren (Gnad *et al.*, 2007). Die Zugänglichkeit, welche durch die Polarität der jeweiligen Aminosäure beeinflusst wird, scheint hierbei eine Voraussetzung für die Phosphorylierung darzustellen. So konnte durch Analysen von mehr als 2000 Phospho-Proteinen in HeLa-Zellen gezeigt werden, dass sich an Serinen (80 %), die von den drei Aminosäuren die höchste Polarität zeigen, und Threoninen (18 %) deutlich häufiger Phosphorylierungen finden als an Tyrosinen (2 %), die aufgrund ihrer höheren hydrophoben Eigenschaften tendenziell in weniger zugänglichen Protein-Regionen lokalisiert sind (Olsen *et al.*, 2006; Gnad *et al.*, 2007).

1.3.2 Posttranskriptionale Modifikationen des Ebf1

Obwohl Ebf1 erstmals 1991 beschrieben und seither sowohl biologisch als auch biochemisch charakterisiert wurde, konnten bisher keine posttranskriptionalen Modifikation des Ebf1-Proteins identifiziert werden (Hagman *et al.* 1991; Feldhaus *et al.*, 1992). Die zentrale Funktion von Ebf1 in der B-Zell-Differenzierung (s. S. 15 ff.) kann jedoch nur besser verstanden werden, wenn es gelingt, Ebf1 in eine Hierarchie modifizierender Faktoren sowie interagierender Proteine einzuordnen.

Posttranskriptionale Modifikationen in Form von Phosphorylierungen beeinflussen maßgeblich die Synthese, Stabilität, Lokalisation, Funktion und Interaktion von Proteinen (s. S. 26) und könnten somit an der Regulation des Ebf1 in der B-Zell-Differenzierung beteiligt sein. So wird für den Transkriptionsfaktor E2A, der zusammen mit Ebf1 die Spezifizierung lymphatischer Vorläuferzellen in B-Zellen vermittelt, eine Regulation durch Phosphorylierungen vermutet. Eine Hypophosphorylierung einer trunkierten E2A-Spleißvariante E47 in der N-terminal vor der *basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH)-Domäne gelegenen Region war hierbei Voraussetzung für die *in vitro*-DNA-Bindung von E47-Homodimeren (Sloan *et al.*, 1996).

Traditionell wurden Phosphorylierungsstellen *in vitro* oder *in vivo* identifiziert, indem Phosphopeptide durch ^{32}P radioaktiv markiert und anschließend mittels des Edman-Abbaus sequenziert wurden (Edman, 1949; Hunter, 2000). Durch enorme Fortschritte in der Massenspektrometrie wird diese jedoch inzwischen standardmäßig zur Identifizierung von

Phosphorylierungsstellen eingesetzt. Ein Massenspektrometer erkennt hierbei die durch eine Phosphorylierung erhöhte molekulare Masse einer Aminosäure (Jensen, 2004). Bei bekannter Proteinsequenz kann so durch den Vergleich der detektierten atomaren Masse mit der kalkulierten atomaren Masse der nicht modifizierten Aminosäure eine Phosphorylierung detektiert werden. Die Bestimmung modifizierter Aminosäuren erfolgt schließlich mittels Tandem-Massenspektrometrie-basierter Sequenzierung (Mortz *et al.*, 1996; Sherman & Kinter, 2000; Jensen, 2004).

In Vorarbeiten gelang es Dr. Gerald Burgstaller (HMGU München) in Kooperation mit Dr. Hakan Sarioglu (HMGU München, Core Facility Proteomics) mittels Massenspektrometrie posttranskriptionale Modifikationen des *Ebf1* zu identifizieren (nicht veröffentlichte Daten). Hierzu wurde Flag-gekoppeltes *Ebf1* ektopisch sowohl in HEK293T- als auch in der Prä-B-Zelllinie 18-81 exprimiert und anschließend mittels eines anti-Flag-Antikörpers immunpräzipitiert (Abbildung 1.7A). Als Negativkontrolle (*Beads only*) wurde die Immunpräzipitation (IP) mit Protein G-*Beads* ohne Verwendung des anti-Flag-Antikörpers durchgeführt. Immunpräzipitierte Proteine wurden in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend mittels einer Silbernitratlösung angefärbt (Abbildung 1.7B). Das *Ebf1*-enthaltene Gelfragment wurde für weiterführende Analysen von Dr. Hakan Sarioglu prozessiert und die aufgereinigten Proteine schließlich mittels Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 1.7C). Hierbei konnten in beiden Zelllinien verschiedene posttranskriptionale Modifikationen detektiert werden. Neben diversen Oxidationen an Methionin- und Carbamidomethylierungen an Cystein-Resten (nicht dargestellt) konnten mehrere Phosphorylierungsstellen identifiziert werden, u.a. das Tyrosin an Position 412 des *Ebf1* (*Ebf1-Y412*), welches am Ende der dritten Helix der konservierten Helix-Loop-Helix-Domäne lokalisiert ist (Abbildung 1.7D und S. 30 ff.). Die *Ebf1-Y412*-Phosphorylierung konnte sowohl in HEK293T- als auch in 18-81-Zellen detektiert werden (in Abbildung 1.7C exemplarisch dargestellt für HEK293T-Zellen), wobei die Analysen der Massenspekrogramme auf eine konstitutive Phosphorylierung in HEK293T-Zellen hindeuten, während in der Prä-B-Zelllinie 18-81 nur eine kleine Fraktion der *Ebf1*-Proteine an dieser Position phosphoryliert zu sein scheint. Dies könnte auf einen regulierten Prozess der *Ebf1-Y412*-Phosphorylierung in B-Zellen und somit eine funktionelle Relevanz dieser Phosphorylierungsstelle deuten.

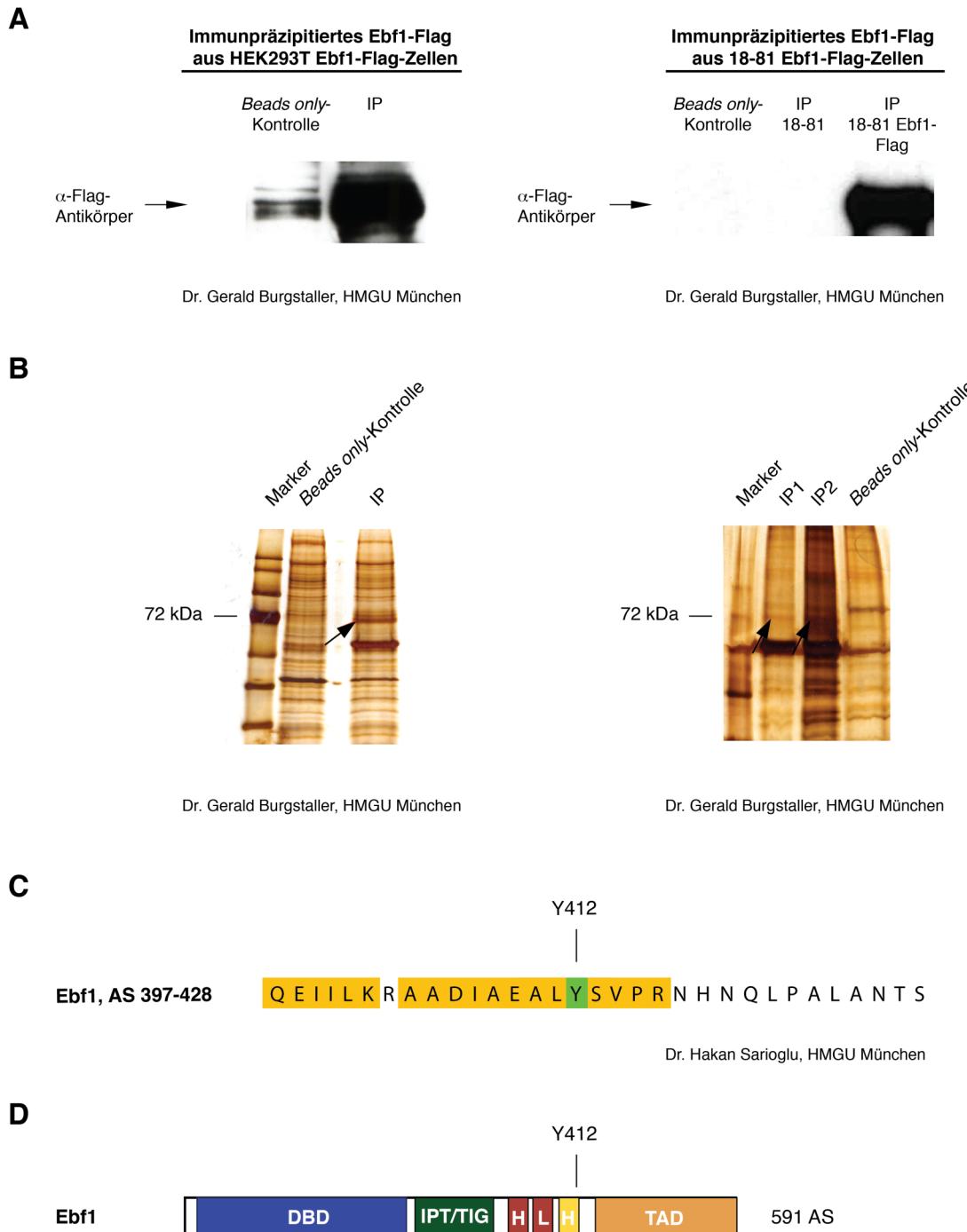


Abbildung 1.7: Identifizierung posttranslationaler Modifikationen des Ebf1

A: Western Blot-Analyse von immunpräzipitiertem Ebf1-Flag aus HEK293T- (links) oder 18-81-Zellen (rechts), welche ektopisch *Ebf1-Flag* exprimieren (Dr. Gerald Burgstaller, HMGU München). Der Western Blot sowie die Immunpräzipitation (IP) erfolgten unter Verwendung des Antikörpers „Anti-FLAG® M2“ (Sigma). Als Negativkontrolle (*Beads only*-Kontrolle) wurde die IP mit Protein G-*Beads* ohne Verwendung des α -Flag-Antikörpers durchgeführt. Als zusätzliche Negativkontrolle für die IP von Ebf1-Flag aus 18-81 Ebf1-Flag-Zellen wurden 18-81-Zellen verwendet, die lediglich endogenes *Ebf1* exprimieren (IP 18-81). **B:** Silberfärbung immunpräzipitierter Proteine (s. A) aus HEK293T Ebf1-Flag- (links) oder 18-81 Ebf1-Flag-Zellen (rechts) nach vorheriger Auf trennung in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel (Dr. Gerald Burgstaller, HMGU München). Immunpräzipitiertes Ebf1-Flag ist durch Pfeile gekennzeichnet. Für Ebf1-Flag aus 18-81 Ebf1-Flag-Zellen sind zwei unabhängige IPs gezeigt (IP1, IP2). **C:** Sequenzieller Ausschnitt des

Massenspektrogramms von aufgereinigtem Ebf1-Flag aus HEK293T Ebf1-Flag-Zellen. Gezeigt ist der Bereich zwischen den Aminosäuren (AS) 397-428 des Ebf1. In der Massenspektrometrie detektierte Peptidsequenzen sind gelb unterlegt. Das durch eine Phosphorylierung modifizierte Y412 ist grün markiert. Die Massenspektrometrie wurde von Dr. Hakan Sarioglu (HMGU München, Core Facility Proteomics) durchgeführt. **D:** Schematische Darstellung der Position Y412 im Ebf1. DBD: DNA-Bindedomäne; IPT/TIG: *Immunoglobulin-like, plexins, transcription factors/transcription factor immunoglobulin*; HLH: *Helix Loop Helix*; TAD: Transaktivierungsdomäne.

1.4 Die Ebf-Proteinfamilie

1.4.1 Ebf-Proteine sind untereinander und evolutionär hoch konserviert

Proteine der *Early B cell factor* (Ebf)-Familie bilden eine Gruppe evolutionär hoch konservierter Transkriptionsfaktoren. Als erstes und somit namensgebendes Mitglied dieser Proteinfamilie wurde Anfang der neunziger Jahre das Protein Ebf1 in murinen B-Zellen beschrieben (Hagman *et al.* 1991; Feldhaus *et al.*, 1992). Dem Ebf1 homologe Proteine wurden u.a. auch in *Homo sapiens* (Ebf1) und *Rattus norvegicus* (Olf-1) sowie in den Invertebraten *Drosophila melanogaster* (Collier) und *C. elegans* (CeO/E) identifiziert (Kudrycki *et al.*, 1993; Milatovich *et al.*, 1994; Crozatier *et al.*, 1996; Prasad *et al.*, 1998). In nachfolgenden Jahren konnten in *M. musculus* drei weitere dem Ebf1 hoch homologe Proteine identifiziert werden, die demzufolge Ebf2, Ebf3 und Ebf4 benannt wurden (Garel *et al.*, 1997; Malgaretti *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997 & 2002). Die Proteine Ebf1-4 aus *M. musculus* zeigen mit einer Übereinstimmung der Proteinsequenz von mehr als 75 % untereinander einen hohen Homologiegrad, wobei Ebf1 und Ebf3 die größte Übereinstimmung aufweisen (Dubois & Vincent, 2001). Alle Ebf-Proteine besitzen mehrere Domänen, die innerhalb der Ebf-Proteinfamilie mit bis zu 98 % identischen Aminosäuresequenzen stark konserviert sind (Abbildung 1.8; Liberg *et al.*, 2002). Für die Ebf-Proteine Ebf1-4 konnte gezeigt werden, dass diese *in vitro* in Form von Homo- und Heterodimeren an dieselbe DNA-Sequenz, einer Variation der palindromischen Sequenz 5'-ATTCCCNNGGAAT-3', binden (Hagman *et al.*, 1993 & 1995; Travis *et al.*, 1993; Wang & Reed, 1993; Wang *et al.*, 1997 & 2002; Treiber *et al.*, 2010a).

Die Dimerisierung der Ebf-Proteine erfolgt über eine hoch konservierte atypische *Helix Loop Helix* (HLH)-Domäne (Hagman *et al.*, 1995; Daburon *et al.*, 2008). Diese Domäne besteht bei Vertebraten aus drei alpha-Helices, wobei die ersten beiden Helices dem typischen HLH-Motiv bekannter HLH-Proteine ähneln (Vinson & Garcia, 1992; Kee *et al.*, 2000; Liberg *et al.*, 2002), während die dritte Helix wahrscheinlich durch Exon-Duplikation der zweiten

Helix entstanden ist und daher eine große Ähnlichkeit zu dieser aufweist (Hagman *et al.*, 1993 & 1995). Inwieweit diese dritte Helix zur Dimerisierung der Ebf-Proteine beiträgt, ist bislang noch nicht ausreichend charakterisiert (Treiber *et al.*, 2010a).

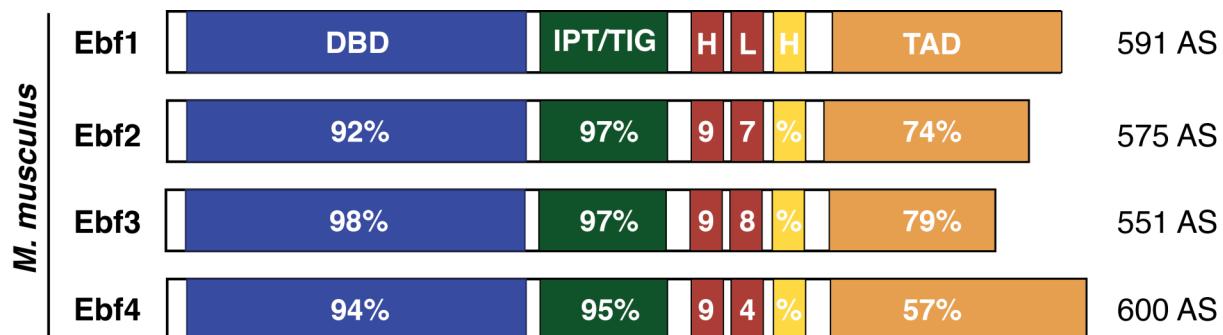


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Struktur und Konservierung der Ebf-Proteine Ebf1-4 in *M. musculus*

Angegebene Prozentzahlen geben die Übereinstimmung in der Proteinsequenz der jeweiligen Domäne in Relation zu Ebf1 an. DBD: DNA-Bindedomäne; IPT/TIG: *Immunoglobulin-like, plexins, transcription factors/transcription factor immunoglobulin*; HLH: *Helix Loop Helix*; TAD: Transaktivierungsdomäne. In Anlehnung an Dubois & Vincent, 2001; Liao, 2009; Hiechinger, 2010; persönliche Kommunikation Bettina Groll, HMGU München.

Die DNA-Bindung dimerisierter Ebf-Proteine erfolgt über die N-terminal gelegene hoch konservierte DNA-Bindedomäne (DBD), ein darin lokalisiertes Zink-Finger-Motiv neuartiger Struktur sowie eine so genannte „GH-Schleife“, welche außerhalb der Ebf-Bindestelle Wasserstoffbrückenbindungen zur DNA ausbildet (Hagman *et al.*, 1993 & 1995; Schwabe & Klug, 1994; Treiber *et al.*, 2010a). Die DBD weist mit einer Pseudo-Immunglobulin-ähnlichen Faltung eine neuartige Topologie auf, zeigt jedoch strukturelle Ähnlichkeiten zu der Rel-Homologie-Domäne von NFAT und NF-κB (Treiber *et al.*, 2010a). In Kristallisationsstudien konnte für Ebf1 gezeigt werden, dass dieses in Form eines Dimers an DNA bindet, wobei jedes Ebf1-Monomer mit beiden Hälften der palindromischen Ebf-Bindestelle interagiert (Treiber *et al.*, 2010a). Durch diese außergewöhnliche Art der DNA-Bindung wird ein relativ großer Bereich der DNA durch Ebf1 okkupiert, wodurch die Chromatin-modulierenden Funktionen des Ebf1 begründet sein könnten (Maier *et al.*, 2004; Treiber *et al.*, 2010a & 2010b).

Mit dem C-Terminus der DBD über einen flexiblen Linker verbunden befindet sich in allen Ebf-Proteinen eine weitere hoch konservierte Domäne, welche eine große Ähnlichkeit zur *Immunoglobulin-like, plexins, transcription factors/transcription factor immunoglobulin* (IPT/TIG)-Domäne bekannter Transkriptionsfaktoren wie z.B. NFAT oder NF-κB aufweist

(Aravind & Koonin, 1999; Bork *et al.*, 1999; Treiber *et al.*, 2010a). Die Rolle dieser Domäne für die Funktion der Ebf-Proteine ist noch unbekannt, jedoch wird über eine Beteilung der IPT/TIG-Domäne an Protein-Protein-Interaktionen sowie der Dimerisierung der Ebf-Monomere spekuliert (Tsai & Reed, 1997; Liberg *et al.*, 2002; Treiber *et al.*, 2010a).

Die mit bis zu 79 % identischer Proteinsequenz unter den Ebf-Proteinen am wenigsten konservierte Domäne ist die C-terminal gelegene Transaktivierungsdomäne (TAD), welche die Transaktivierung von Ebf-Zielgenen vermittelt (Hagman *et al.*, 1995). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Deletionsmutanten von Ebfl, in denen die C-terminale Transaktivierungsdomäne fehlt, dennoch Transaktivierungspotential aufweisen, woraufhin eine zweite, in der DBD lokalisierte, Transaktivierungsdomäne identifiziert wurde (Hagman *et al.*, 1995).

1.4.2 Ebfl

Eine *Ebfl*-Expression kann nicht nur in B-Zellen, sondern in zahlreichen weiteren Organen detektiert werden, u.a. im sich entwickelnden Nervensystem und der fötalen Leber, sowie im olfaktorischen Epithel, Kleinhirn, Milz, Herz, Lunge, Niere und Fettgewebe (Hagman *et al.*, 1993; Garel *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997, Yokota *et al.*, 2003). Neben der bereits beschriebenen Funktion in der B-Zell-Differenzierung ist Ebfl beispielsweise an der Regulation der Entwicklung von Adipozyten, Osteoblasten und Neuronen involviert (Akerblad *et al.*, 2002; Jimenez *et al.*, 2007; Lobo *et al.*, 2008; Hesslein *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009). Demzufolge zeigen *Ebfl*-defiziente Mäuse gegenüber wt-Tieren diverse Defekte. Zusätzlich zu einer Reduktion in Körpergröße und -gewicht sowie einer Mortalitätsrate von 30 % innerhalb der ersten vier Wochen nach der Geburt weisen *Ebfl*-defiziente Tiere neuronale Defekte auf (Garel *et al.*, 1997, 1999 & 2000). Des Weiteren ist in diesen Tieren die Anzahl der Adipozyten im Knochenmark sowie die Knochenbildungsraten in Tibia und Femur stark erhöht (Hesslein *et al.*, 2009).

1.4.3 Ebf2

Das Protein Ebf2 wurde 1997 in *M. musculus* identifiziert (Garel *et al.*, 1997; Malgaretti *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). Erste *Ebf2*-Expressionsstudien wurden durch Analysen eines *Ebf2-LacZ* Mausmodells ergänzt, in dem das Gen *LacZ* unmittelbar nach der Translationsinitiationsstelle im *Ebf2*-Gen inseriert ist (Garel *et al.*, 1997; Malgaretti

et al., 1997; Wang *et al.*, 1997; Corradi *et al.*; 2003). Hierbei konnte eine *Ebf2*-Expression ab dem Tag E9 im ersten und zweiten Kiemenbogen, in den sich bildenden Sklerotomen der Somiten (E10) und im dorsalen Wurzelganglion (E12,5) detektiert werden. 16,5 Tage nach der Befruchtung wurde eine Expression von *Ebf2* ebenfalls in knochenbildenden Regionen sowie im neuronalen und Fett-Gewebe nachgewiesen (Corradi *et al.*; 2003; Kieslinger *et al.*, 2005). Die Analyse von aus neonatalen Mäusen isolierten *Ebf2*-LacZ-positiven Zellen zeigte die Expression von *Ebf2* in unreifen Osteoblasten des Knochenmarks (Kieslinger *et al.*, 2005). In adulten Tieren ist *Ebf2* u.a. in der Milz, dem Thymus sowie dem Gehirn exprimiert (Kieslinger *et al.*, 2010).

Ebf2-defiziente Mäuse zeigen gegenüber wt-Tieren eine erhöhte Mortalitätsrate sowie eine Reduktion in der Körpergröße und dem Gewicht (Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Kieslinger *et al.*, 2005). Während die Knochenbildungsraten in diesen Tieren normal verlaufen, kann eine verringerte Knochendichte sowie eine erhöhte Knochenresorption beobachtet werden. *Ebf2* konnte hierbei als Regulator der Osteoblasten-abhängigen Differenzierung von Osteoklasten identifiziert werden (Kieslinger *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde für *Ebf2* eine unterstützende Funktion für den Erhalt hämatopoietischer Stammzellen gezeigt (Hiechinger, 2010; Kieslinger *et al.*, 2010). Zudem weisen *Ebf2*-defiziente Mäuse neuronale Defekte auf. So konnte bereits die Regulierung der Morphogenese peripherer Nerven, der Migration Hormon-freisetzender Neuronen vom vomeronasalen Organ zum Hypothalamus während der Embryonalentwicklung und der Anlage olfaktorischer Neuronen durch *Ebf2* gezeigt werden (Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004).

1.4.4 *Ebf3*

Wie *Ebf2* wurde das Protein *Ebf3* 1997 in *M. musculus* identifiziert (Garel *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). Während der Embryonalentwicklung kann eine *Ebf3*-Expression z.B. im sich entwickelnden Nervensystem detektiert werden (Garel *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997). In adulten Tieren wurde eine Expression von *Ebf3* u.a. im Kleinhirn, im olfaktorischen Epithel, im vomeronasalen Organ, im Skelettmuskel, im Herz sowie in Adipozyten beobachtet (Garel *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997 & 2002; Akerblad *et al.*, 2002).

Die Deletion von *Ebf3* in *M. musculus* resultiert in einer Letalität der Mäuse innerhalb der ersten zwei Tage nach der Geburt (Wang *et al.*, 2004). Von der Größe und dem Gewicht her nicht von wt-Tieren zu unterscheiden, wirken die neugeborenen Mäuse zyanotisch und zeigen

eine Schnappatmung (persönliche Kommunikation Bettina Groll, HMGU München). Die Ursachen, die zu diesem Phänotyp führen, sind bisher noch nicht bekannt.

Für Ebf3 wurde eine Funktion als mögliches Tumorsuppressor-Gen im Gehirn beschrieben. Während eine Expression von *Ebf3* in gesunden Zellen des Gehirns detektiert werden kann, wurden in Tumorzellen des Gehirns Deletionen bzw. Hypermethylationen des *Ebf3*-Lokus beobachtet (Zardo *et al.*, 2002). Eine ebenfalls verminderte *Ebf3*-Expression konnte in Tumorgewebe der Leber, des Darms sowie im Kopf-Hals-Karzinom detektiert werden (Chen *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2006; Bennett *et al.*, 2008). Dementsprechend konnte eine Regulation von Genen, die im Zellzyklus und der Apoptose von Zellen involviert sind, wie beispielsweise *Cyclin A*, *Cyclin B* oder *p21*, durch Ebf3 gezeigt werden (Zhao *et al.*, 2006).

1.4.5 Ebf4

Das 2002 in *M. musculus* identifizierte Protein Ebf4 ist das bisher am wenigsten charakterisierte Mitglied der Ebf-Proteinfamilie (Wang *et al.*, 2002). Analysen des Expressionsmusters ergaben eine *Ebf4*-Expression im olfaktorischen Epithel, im Riechkolben, im Kleinhirn sowie in der Lunge, Milz und Niere (Wang *et al.*, 2002). Wie die anderen in *M. musculus* bekannten Proteine der Ebf-Familie bindet Ebf4 in Form von Homo- oder Heterodimeren an die Ebf-Konsensussequenz (Hagman *et al.*, 1993 & 1995; Travis *et al.*, 1993; Wang & Reed, 1993; Wang *et al.*, 1997 & 2002). Allerdings wies Ebf4 in Luziferase-Reporter-Assays im Gegensatz zu den Proteinen Ebf1-3 nur ein schwaches Transaktivierungspotential auf, was durch die vergleichsweise geringe Homologie der Transaktivierungsdomäne des Ebf4 im Vergleich zu den anderen Ebf-Proteinen begründet sein könnte (Wang *et al.*, 2002). Da Ebf4 nur schwach aktivierend wirkt und nachweislich über die HLH-Domäne eine Dimerisierung mit den anderen Ebf-Proteinen eingeht, wird darüber spekuliert, ob Ebf4 als Regulator der Ebf-Proteine Ebf1-3 agiert und auf diese Weise die Expression von Ebf-Zielgenen steuert (Wang *et al.*, 2002).

1.4.6 Proteine der Ebf-Familie scheinen redundante, aber auch spezifische Funktionen ausüben zu können

Wie bereits beschrieben (s. S. 30) sind die Ebf-Proteine sowohl untereinander als auch evolutionär hoch konserviert. Zudem konnte eine oftmals simultane und überlappende Expression der Ebf-Proteine in vielen Geweben gezeigt werden. Die ausgeprägte

Konservierung und überlappende Expressionsmuster sowie die Tatsache, dass die Ebf-Proteine in Form von Homo- oder Heterodimeren an dieselbe DNA-Sequenz binden (s. S. 30), lassen eine redundante Funktion der Ebf-Proteine vermuten.

So zeigten Studien der Beinentwicklung bei Maus und Huhn sowie der Retina von Mausembryonen eine Koexpression der Ebf-Proteine in den analysierten Geweben (Mella *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2010). Des Weiteren findet sich eine überlappende Expression der Ebf-Proteine u.a. in Adipozyten, Osteoblasten sowie verschiedenen Neuronen (Hagman *et al.*, 1993; Garel *et al.*, 1997; Malgaretti *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997 & 2004; Akerblad *et al.*, 2002; Corradi *et al.*; 2003; Kieslinger *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2007; Hesslein *et al.*, 2009). In adulten Mäusen werden beispielsweise alle vier Ebf-Proteine in Rezeptor-Neuronen des olfaktorischen Epithels exprimiert, in welchen sie die Expression olfaktorischer Gene regulieren (Wang *et al.*, 1997, 2002 & 2004). In der murinen Embryonalentwicklung kann eine Expression aller Ebf-Proteine in Neuronen des sich entwickelnden Nervensystems detektiert werden, was darauf hindeutet könnte, dass Ebf-Proteine an der Regulation der Reifung von Neuronen beteiligt sind (Garel *et al.*, 1997 & 1999; Malgaretti *et al.*, 1997).

Mittels histologischer Analysen des Gehirns und des olfaktorischen Epithels *Ebf1*-defizienter Mäuse konnte jedoch keine abnormale Entwicklung dieser Organe beobachtet werden (Lin & Grosschedl, 1995), was auf eine Redundanz koexprimierter Ebf-Proteine in diesen Geweben hindeuten könnte. Defekte treten hingegen in Geweben auf, in denen *Ebf1* als einziges Mitglied der Ebf-Familie exprimiert wird. So zeigen *Ebf1*-defizierte Mäuse spezifische Defekte im embryonalen Striatum und der Migration von Neuronen im Rhombencephalon (Garel *et al.*, 1997, 1999, 2000 & 2002) sowie eine arretierte B-Zell-Differenzierung (s. S. 15 ff.).

Einen weiteren Hinweis auf eine redundante Funktion der Ebf-Proteine liefern *in vitro*-Analysen unreifer Osteoblasten. Kieslinger *et al.* (2005) konnten in unreifen, *Ebf2*-exprimierenden Osteoblasten, welche eine unterstützende Funktion im Erhalt hämatopoietischer Stammzellen ausüben (Hiechinger *et al.*, 2010; Kieslinger *et al.*, 2010), eine Koexpression von *Ebf1* und *Ebf3* nachweisen. Durch einen kombinierten *Knock down* der Ebf-Proteine in *Ebf2*-defizienten Osteoblasten konnte *in vitro* die verminderte Fähigkeit dieser Zellen zur Unterstützung hämatopoietischer Stammzellen weiter reduziert werden. Dies deutet auf eine redundante Funktion der Ebf-Proteine in der Osteoblasten-abhängigen Unterstützung hämatopoietischer Stammzellen hin (Kieslinger *et al.*, 2010).

Zahlreiche Studien lassen jedoch auch spezifische Funktionen der Ebf-Proteine vermuten. So zeigen für *Ebf1*, *Ebf2* oder *Ebf3*-defizierte Mäuse trotz oftmals überlappender Expression der

Ebf-Proteine einen jeweils unterschiedlichen Phänotyp (s. S. 32-33). Während *Ebf1*- und *Ebf2*-defiziente Tiere beispielsweise lebensfähig sind, führt eine Deletion von *Ebf3* zu einer neonatalen Letalität (Lin & Grosschedl, 1995; Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Kieslinger *et al.*, 2005).

Ebf2- und *Ebf3*-defizienten Mäusen gemein ist jedoch ein Defekt in der Anlage olfaktorischer Neuronen (Corradi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Wie bereits beschrieben sind alle vier Ebf-Proteine im olfaktorischen Epithel überlappend exprimiert. Durch Analysen *Ebf2*^{GFP/+}/*Ebf3*^{lacZ/+} doppelt-heterozygoter Mäuse konnte ein Defekt in der Anlage olfaktorischer Neuronen in diesen Tieren gezeigt werden, der dem *Ebf2*- oder *Ebf3*-defizienter Tiere ähnelt. Dies deutet auf eine Kombination *Ebf2*- und *Ebf3*-spezifischer Funktionen sowie einen Gen-Dosis-Effekt hin (Wang *et al.*, 2004).

Zudem konnte für *Ebf1* und *Ebf2* eine unterschiedliche Funktion in der Entwicklung von Osteoblasten und Adipozyten gezeigt werden. Während in *Ebf1*-defizienten Tieren die Knochenbildungsrate in Femur und Tibia erhöht ist, weisen *Ebf2*-defiziente Mäuse eine verringerte Knochendichte und erhöhte Knochenresorption auf (Kieslinger *et al.*, 2005; Hesslein *et al.*, 2009).

Auch in bestimmten neuronalen Zelltypen zeigen Ebf-Proteine eine nur partiell überlappende Expression und scheinen daher spezifische Funktionen auszuüben (Garel *et al.*, 1997, 1999 & 2000). So wird beispielsweise *Ebf2* in Neuronen des Rückenmarks früher als *Ebf1* und *Ebf3* aktiviert (Garel *et al.*, 1997).

Die Funktion von Ebf4 *in vivo* ist bisher noch unbekannt. *In vitro* konnte jedoch für Ebf4 ein gegenüber den Proteinen Ebf1-3 vermindertes Transaktivierungspotential gezeigt werden. Da wie schon beschrieben alle vier Ebf-Proteine in verschiedenen Geweben überlappend exprimiert werden und Ebf4 nachweislich Heterodimere mit den anderen Ebf-Proteinen bilden kann, wird über eine Funktion des Ebf4 als Regulator der Proteine Ebf1-3 spekuliert (s. S. 34).

1.5 Zielsetzung

Die frühe B-Zell-Differenzierung wird durch verschiedene Signalwege sowie ein komplexes Netzwerk diverser Transkriptionsfaktoren reguliert, in welchem Ebf1 eine zentrale Funktion einnimmt. Bislang wurden jedoch weder interagierende Proteine noch posttranskriptionale Modifikationen für Ebf1 beschrieben. Erst kürzlich konnten in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe posttranskriptionale Modifikationen des Ebf1 identifiziert werden, u.a. die Phosphorylierungsstelle Y412. Da Phosphorylierungen maßgeblich die Funktion von Proteinen beeinflussen können, sollte im ersten Teil dieser Arbeit die Phosphorylierungsstelle Ebf1-Y412 charakterisiert werden, um somit zu einem besseren Verständnis der Regulation und Funktion von Ebf1 in der B-Zell-Differenzierung zu gelangen. Ziel war es zunächst, diese Phosphorylierungsstelle mittels neu generierter Antikörper, welche spezifisch phosphoryliertes Ebf1-Y412 erkennen sollen, zu bestätigen. Anschließend sollte die Ebf1-Y412-Phosphorylierung hinsichtlich des Phosphorylierungsstatus während der murinen B-Zell-Differenzierung, der biologischen und biochemischen Funktion sowie deren Regulierung charakterisiert werden.

Die Ebf-Familie umfasst in *M. musculus* insgesamt vier Transkriptionsfaktoren (Ebf1-4), für die aufgrund ihrer hohen Homologie und Expressionsmuster redundante Funktionen vermutet werden. Analysen potentiell redundanten Wirkungsweisen werden jedoch durch die in vielen murinen Geweben simultane und überlappende Expression der Ebf-Proteine erschwert. In B-Zellen hingegen ist *Ebf1* als einziges Mitglied der Ebf-Familie exprimiert. Da durch eine ektopische *Ebf1*-Expression in *Ebf1*-defizienten Zellen die arretierte B-Zell-Differenzierung in diesen Zellen wiederhergestellt werden kann, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit anhand dieses experimentellen Systems untersucht werden, ob die murinen Ebf-Proteine eine redundante Wirkungsweise in der B-Zell-Differenzierung zeigen. Des Weiteren sollte die Fähigkeit der verschiedenen Ebf-Proteine zur Transaktivierung B-Zell-spezifischer Gene analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| Geräte | Bezugsquelle |
|-------------------------------------|---|
| Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur | Model 40-1214; Peqlab Biotechnologie GmbH |
| Bestrahlungsanlage | Gammacell 40; MDS Nordion |
| Blotting-Apparatur | Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell; Biorad |
| CO ₂ -Inkubator | CB150; Binder |
| Durchflusszytometer | FACSCalibur™ Flow Cytometer; BD Biosciences |
| Elektroporationssystem | Gene Pulser® II; BioRad |
| Flockeneisbereiter | AF100; Scotsman® |
| Feinwaage | Sartorius |
| Geltrockner | BioRad |
| Heizblock | Thermomixer compact; Eppendorf |
| Inkubationsschrank | B6030; Heraeus |
| Kühl- und Gefriergeräte | Liebherr GmbH Privileg; Quelle |
| Luminometer | Microplate Luminometer Orion II; Berthold Detection Systems |
| Light Cycler | LightCycler® 480 II; Roche |
| Magnetrührer | MR3000; Heidolph |
| Mikroskop | Axiovert25; Zeiss |
| Mikrowelle | Panasonic |
| Native PAGE-Apparatur | TV21; CTI GmbH |
| PAGE-Apparatur | Mini Trans-Blot® Cell; Biorad |
| PCR-Maschine | DNA-Engine®; Biorad |
| Photometer | Photometer Bio 6131; Eppendorf |
| Pipetten | Gilson |

| | |
|-------------------------------|---|
| pH-Meter | 763 Multi Calimolic; Knick |
| Röntgenfilmentwicklermaschine | TYPON Optimax; Raymed Imaging AG |
| Schüttler | Polymax1040; Heidolph Reax2; Heidolph |
| Spannungsquelle | PowerPack300X; BioRad |
| Szintillationszähler | BioScan, Inc. |
| Umluft-Sterilbank | HeraSafe® KS12; Thermo Electron Corporation |
| UV-Transilluminator | Transilluminator TL33; HEROLAB GmbH |
| Vakuumpumpe | VACUMAT 120; Bachofen |
| Waage | PJ3000; Mettler |
| Wasserbad | Sub6; Grant |
| Zellzahl-Messgerät | CASY TTC; Innovatis |
| Zellsortierer | FACSAria™ III; BD Biosciences |
| Zentrifugen | Rotina 38R; Hettich Micro 200R; Hettich Rotanta 460R; Hettich |

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

| Bezugsquelle | Produkte |
|----------------------------|--|
| ART® Molecular BioProducts | Gestopfte Spitzen |
| Becton Dickinson (BD) GmbH | Rundbodenröhrchen: 5 ml, 14 ml Rundbodenröhrchen mit in der Kappe integriertem Sieb (35 µm) Konische Röhrchen: 15 ml, 50 ml Luer-Lok™ Spritzen: 20 ml Zellkulturflaschen: 75 cm ² , 175 cm ² Zellkulturplatten: diverse Zellkulturschalen: 10cm Zellsieb, 70 µm Nylon |
| BioRad | Gene Pulser® Cuvette |
| Biozym Diagnostik GmbH | PCR-Reaktionsgefäße: 0,2 ml |

| | |
|----------------------|--|
| Brand | Einmal-Küvetten |
| Braun | 100 Sterican® Kanülen, 0,4 x 20 mm, 27G x 3/4'', Größe 20 |
| CEA GmbH | Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive |
| Corning Incorporated | Sterile Einwegpipetten |
| Eppendorf | Uvette® 220-16 mm Reaktionsgefäße: 1,5 ml, 2 ml |
| Gilson | D10, D200, D1000 Diamond® Tower Pack™ Spalten |
| Millipore | Spritzenfilter: 0,22 µm |
| Nalgene, USA | Einfrierbehälter |
| Nunc GmbH | Cryo Tube™ Vials |
| Pharmacia | Sephadex® G50 Säulen |
| Protran | Nitrozellulose-Membran: Porengröße 0,45 µm |
| Roche Diagnostics | LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 LightCycler® 480 Sealing Foil |
| Schott, Braun | Glaswaren |
| Sigma | Kodak BioMax MS Film |
| USA Scientific | Lumitrac 200 Mikrotiterplatte |
| Whatman GmbH | Gel-Blotting-Papiere: 0,34 mm; 1,2 mm |

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Inhibitoren

| Bezugsquelle | Produkte |
|--------------------|--|
| Applichem | Propidium-Iodid |
| Applied Biosystems | Emerald™ Enhancer; Galacton-Plus® Chemiluminescent Substrate for β-Galactosidase |
| Bayer | Ciprobay® 400 |
| Biochrom AG | Fötale Kälberserum (FCS) |
| Biolab Products | CRYSTAL Agarose |
| Calbiochem | Btk-Inhibitor LFM-A13 |

| | |
|------------------------------|--|
| Fermentas | dNTPs (100 mM) Glycogen |
| Gibco BRL | Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS); L-Glutamine, 200 mM, 100 x; OptiMEM®; Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml & 10.000 µg/ml); Polyethylenimin (PEI); RPMI 1640; Sodium Pyruvate, 100 mM; Trypsin-EDTA, 0,05 % |
| Hartmann Analytic | ³² P-alpha-dCTP (3000 Ci/mol) |
| Invitrogen Life Technologies | 5 x First Strand Buffer; Dithiothreitol (DTT); Oligo(dT)12-18 Primer (0,5 µg/µl); SuperScript® II Reverse Transcriptase (200 U/µl) |
| New England Biolabs | 1 x NEBuffer 2 & 3 Calf Intestinal Alkaline Phophatase (10 U/µl) |
| PAA Laboratories | Bovine Serum Albumin (BSA) |
| PAN Biotech | Fötales Kälberserum (FCS) |
| Peqlab | peqGOLD TriFast™ |
| Promega | RNasin® (40 U/µl) |
| R&D Systems | Recombinant Mouse IL-3; Recombinant Mouse IL-6; Recombinant Mouse IL-7; Recombinant Mouse SCF |
| Roche Diagnostics | Acetyl-Coenzyme A; Aprotinin; ATP disodium salt; Complete, Mini, EDTA-free Tabletten; D(-)-Luciferin; „Klenow Fragment“, 2 U/µl; Leupeptin; LightCycler®480 SYBR Green I Master; Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten; PMSF |
| Roth | Ammoniumpersulfat (APS); Ampicillin; Dimethylsulfoxid (DMSO); EDTA; Ethidiumbromidlösung; Glycerin; Glycin; |

| | |
|---------------|---|
| | Ponceau S; Proteinase K; Rotiphorese® Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1); N,N,N,N-Tetramethylmethylenediamin (TEMED); Tris; Trockenmilchpulver; Tween®20 |
| Sigma | 2-Mercaptoethanol; Chloroform; Luminol Sodium Salt; Nonidet™ P40 Substitute; ρ-Coumaric Acid; Polybren; Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) Acid Sodium Salt (Poly(dI-dC)) |
| Solis BioDyne | 1 x FirePol Puffer B FIREPol® DNA Polymerase (5 U/μl) |
| Symansis | Pan-JAK Inhibitor TG101348 |

Verwendete Chemikalien, die nicht in oben stehender Tabelle aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck, Applichem, Roth oder Sigma bezogen.

2.1.4 Kits

| Kit | Bezugsquelle |
|--|-------------------|
| BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/ Permeabilization Kit | Becton Dickinson |
| LightCycler® 480 SYBR Green I Master | Roche |
| Pierce® BCA Protein Assay Reagent | Thermo SCIENTIFIC |
| QIAGEN® Plasmid Midi/ Maxi Kit | QIAGEN GmbH |
| Quik Change®, Site-Directed Mutagenesis Kit | Stratagene |
| TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems | Promega |

2.1.5 Längenstandards

| Längenstandard | Bezugsquelle |
|--------------------------------------|--------------|
| GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder | Fermentas |
| PageRuler™ Prestained Protein Ladder | Fermentas |

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Synthetisches Peptid zur Erzeugung von anti-Ebf1-Y(p)412-Antikörpern

Zur Erzeugung von anti-Ebf1-Y(p)412-Antikörpern (Dr. E. Kremmer, HMGU München) wurde das synthetische Peptid EALY(p)SVPRNHC (Ebf1: Aminosäuren 409-418) verwendet (PSL GmbH, Heidelberg). Aus Löslichkeitsgründen sowie um die Präferenz der Phosphoaminoäure hervorzuheben, wurde der Peptidsequenz C-terminal ein Cystein angefügt.

2.1.6.2 Antikörper für Western Blot-Analysen

| Antikörper | Bezugsquelle | Spezies | Verdünnung | Verdünnung in |
|--|---------------------|---------|------------|---|
| Anti-β-Actin Monoclonal Antibody, Klon AC-74 | Sigma | Maus | 1:10.000 | 1 x PBS 5 % Trockenmilchpulver 0,4 % Tween®20 |
| Anti-Ebf1-Y412, Klon 3G5, Isotyp IgG2a (monoklonal) | E. Kremmer, HMGU | Maus | 1:2 | 1 x TBS 5 % BSA 0,4 % Tween®20 |
| Anti-Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, Isotyp IgG2b (monoklonal) | E. Kremmer, HMGU | Maus | 1:2 | 1 x TBS 5 % BSA 0,4 % Tween®20 |
| Anti-Ebf1-Y(n.p)412, Klon 1B4, Isotyp IgG2a+2b (monoklonal) | E. Kremmer, HMGU | Maus | 1:2 | 1 x TBS 5 % BSA 0,4 % Tween®20 |
| Anti-FLAG® M2 Monoclonal Antibody | Sigma | Maus | 1:10.000 | 1 x PBS 5 % Trockenmilchpulver 0,4 % Tween®20 |
| Anti-Pan-Ebf, Klon 5E6-111, Isotyp IgG2A (monoklonal) | E. Kremmer, HMGU | Ratte | 1:2 | 1 x PBS 5 % Trockenmilchpulver 0,4 % Tween®20 |
| Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10® | Millipore | Maus | 1:1000 | 1 x TBS 3 % Trockenmilchpulver |

| | | | | |
|---|-------------------------------|-------|-------------------|---|
| (monoklonal) | | | | |
| Goat Anti-Mouse IgG (Fc Specific)-Peroxidase (polyklonal) | Sigma | Ziege | 1:2500- 1:5000 | Entsprechend dem verwendeten Erstantikörper |
| Goat Anti-Rat IgG+IgM Peroxidase-conjugated (polyklonal) | Jackson Immuno Research | Ziege | 1:2500- 1:5000 | Entsprechend dem verwendeten Erstantikörper |

2.1.6.3 Antikörper für Durchflusszytometrie und Zellsortierung

| Antikörper | Bezugsquelle | Spezies | Verdünnung |
|--|---------------|---------|------------|
| Anti-CD16/CD32 (Fcγ III/II Rezeptor), Klon 2.4G2 | BD Pharmingen | Ratte | 1:250 |
| Anti-B220-APC, Klon RA3-6B2 | eBioscience | Ratte | 1:1000 |
| Anti-B220-eFluor® 450, Klon RA3-6B2 | eBioscience | Ratte | 1:500 |
| Anti-B220-FITC, Klon RA3-6B2 | BD Pharmingen | Ratte | 1:2000 |
| Anti-B220-PE, Klon RA3-6B2 | BD Pharmingen | Ratte | 1:500 |
| Anti-BP-1-Biotin, Klon 6C3 | eBioscience | Ratte | 1:500 |
| Anti-CD19-Biotin, Klon 1D3 | eBioscience | Ratte | 1:500 |
| Anti-CD24-FITC, Klon 30-F1 | eBioscience | Ratte | 1:3000 |
| Anti-CD43-APC, Klon S7 | BD Pharmingen | Ratte | 1:500 |
| Anti-CD43-PE, Klon S7 | BD Pharmingen | Ratte | 1:500 |
| Anti-CD45.2-APC, Klon 104 | eBioscience | Maus | 1:3500 |

| | | | |
|--------------------------------|---------------|-------|-------|
| Anti-IgD-Biotin, Klon 11-26 | eBioscience | Ratte | 1:500 |
| Anti-IgM-APC, Klon II/41 | eBioscience | Ratte | 1:250 |
| Streptavidin-PE | BD Pharmingen | | 1:500 |
| Streptavidin-PerCP- Cy5.5 | BD Pharmingen | | 1:500 |

2.1.6.4 Antikörper für intrazelluläre Durchflusszytometrie

| Antikörper | Bezugsquelle | Spezies | Verdünnung |
|---------------------------------------|------------------|---------|------------|
| Anti-Ebf1-Y412, Klon 3G5, IgG2a | E. Kremmer, HMGU | Maus | 1:30 |
| Anti-Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, IgG2b | E. Kremmer, HMGU | Maus | 1:30 |
| F(ab')2 Anti-Mouse IgG PE | eBioscience | Esel | 1:100 |

2.1.7 Oligonukleotide

Sämtliche aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

2.1.7.1 Oligonukleotide für quantitative PCR-Reaktionen

| Oligonukleotid | Sequenz 5' → 3' | Amplifikationsprodukt [bp] |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|
| β-Aktin FP | TGT GGT GGT GAA GCT GTA GC | 380 |
| β-Aktin RP | GAC GAC ATG GAG AAG ATC TGG | |
| Ebf1 FP | CAT GTC CTG GCA GTC TCT GA | 240 |
| Ebf1 RP | CAA CTC ACT CCA GAC CAG CA | |
| Ebf2 FP | TGG AGA ATG ACA AAG AGC AAG | 337 |
| Ebf2 RP | GGG TTT CCC GCT GTT TTC AAA | |
| Ebf3 FP | AGA GCC GAA CAA CGA GAA AA | 163 |
| Ebf3 RP | GCA CAT CTC CGG ATT CTT GT | |

| | | |
|-----------------|--------------------------------|-----|
| <i>Ebf4</i> FP | TTG ACT CCA TGT CGA AGC AG | 203 |
| <i>Ebf4</i> RP | GCA GTT CTG GTT GCA TTT GA | |
| <i>Hprt</i> FP | TGC TGG TGA AAA GGA CCT CTC G | 310 |
| <i>Hprt</i> RP | TCT GGG GAC GCA GCA ACT GA | |
| <i>Mb-1</i> FP | CAT CTT GCT GTT CTG TGC AGT G | 68 |
| <i>Mb-1</i> RP | TTC TCA TTT TGC CAC CGT TTC | |
| <i>VpreB</i> FP | GCT CAT GCT GCT GGC CTA TC | 81 |
| <i>VPreB</i> RP | TCC AAG GGA AGA AGA TGC TAA TG | |

2.1.7.2 Oligonukleotide für Maus-Genotypisierungen

| Oligonukleotid | Sequenz 5' → 3' | Amplifikationsprodukt [bp] |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| <i>Ebf1</i> FP | GGA AAA GTT GCC TTG AAG TTG | |
| <i>Ebf1</i> RP | TGT AGA GGA GCT GGA GCC G | 150 |
| <i>Ebf1</i> - <i>Neo</i> RP | GCG ATG CCT GCT TGC CGA A | 400 |

2.1.7.3 Oligonukleotide für die punktgerichtete Mutagenese

| Oligonukleotid | Sequenz 5' → 3' |
|-----------------------|-------------------------------------|
| <i>Ebf1</i> -Y412F FP | GCA GAG GCT CTG TTC AGT GTC CCT CGG |
| <i>Ebf1</i> -Y412F RP | CCG AGG GAC ACT GAA CAG AGC CTC TGC |
| <i>Ebf1</i> -Y412D FP | GCA GAG GCT CTG GAC AGT GTC CCT CGG |
| <i>Ebf1</i> -Y412D RP | CCG AGG GAC ACT GTC CAG AGC CTC TGC |
| <i>Ebf1</i> -S413A FP | G GCT CTG TAC GCT GTC CCT CGG |
| <i>Ebf1</i> -S413A RP | CCG AGG GAC AGC GTA CAG AGC C |

2.1.7.4 Oligonukleotide für Gelretardierungen

| Oligonukleotid | Sequenz 5' → 3' |
|----------------|--|
| <i>Mb-1</i> FP | CCC CGA CCC CAC GCA CTA GAG AGA GAC TCA AGG GAA TTG TGG |
| <i>Mb-1</i> RP | CCC TGC ACC TGG GCT GGC CAC AAT TCC CTT GAG TCT CTC TC |

2.1.8 Plasmide

MSCV-IRES-Gfp (Dr. Richard Moriggl, Ludwig Boltzmann Institut, Wien)

Dieser auf dem *Murine stem cell virus* (MSCV) basierende Vektor trägt das *Ebf1*-, *Ebf2*-, *Ebf3*- oder *Ebf4*-Gen (hergestellt durch Dr. Silvia Hiechinger und Dr. Saihong Jin; HMGU München), gefolgt von einer IRES-*Gfp*-Kassette (Interne Ribosomale Eintrittsstelle - Grün-fluoreszierendes Protein). Der Vektor MSCV-*Ebf1*-IRES-*Gfp* diente der Herstellung von MSCV-*Ebf1*-Y412F-IRES-*Gfp* mittels Punktmutagenese. MSCV-basierende Vektoren wurden zur Herstellung der Retrovirus-verpackenden Zelllinie GP+E86 verwendet.

Helper-Plasmid (Dr. Richard Moriggl, Ludwig Boltzmann Institut, Wien)

Dieser Vektor wurde zur Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen verwendet und trägt die für die Replikation und Viruspartikelbildung erforderlichen *gag*-, *pol*- und *env*-Gene.

pBluescript II-KS (+)-*Ebf1* (pBS-*Ebf1*; pBS-Leervektor: Fermentas)

Dieser Vektor trägt das wt-*Ebf1*-Gen (hergestellt durch Dr. Silvia Hiechinger; HMGU München) und wurde zur Herstellung von pBS-*Ebf1*-Y412F verwendet. In dieser Arbeit dienten diese Vektoren der *in vitro*-Translation rekombinanter Proteine mithilfe von Retikulozyten-Extrakten.

pBL-Lambda5-Luc (pBL-Luc-Leervektor: Dr. Ursula Zimber Strobl, HMGU München)

Dieser Vektor trägt das *Luciferase*-Gen unter Kontrolle des *Lambda5*-Promotors (hergestellt durch Dr. Silvia Hiechinger, HMGU München) und wurde in Luziferase-Reporter-Assays eingesetzt.

pcDNA3.1-Flag-*Ebf1* (pCDNA3.1-Flag-Originalplasmid: Dr. Hermann Silje, MPI München)

Dieser Vektor trägt das wt-*Ebf1*-Gen (hergestellt durch Dr. Saihong Jin, HMGU München) und wurde zur Herstellung von pcDNA3.1-Flag-*Ebf1*-Y412F verwendet. In dieser Arbeit dienten diese Vektoren zu Lokalisationsstudien sowie der Überexpression rekombinanter Proteine für Bindungsstudien.

pCMVcyto (Invitrogen Life Technologies)

Dieser Vektor diente der Überexpression von *Ebf1*, *Ebf2*, *Ebf3*, *Ebf4* und *E47* (*E2A*) für Luziferase-Reporter-Assays (hergestellt durch Dr. Silvia Hiechinger und Bettina Groll,

HMGU München). Der Vektor pCMV-*Ebf1* wurde zur Herstellung von pCMV-*Ebf1*-Y412F, pCMV-*Ebf1*-Y412D und pCMV-*Ebf1*-S413A mittels Punktmutagenese verwendet.

pCMV-LacZ (Dr. Ursula Zimber Strobl, HMGU München)

Dieser Vektor diente der Überexpression des *LacZ*-Gens und wurde zur Normalisierung in Luziferase-Reporter-Assays eingesetzt.

2.1.9 Bakterien

XL1-Blue

Hierbei handelt es sich um einen *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm des Genotyps F':Tu10 proA+B+laclq D (lacZ) M15/recA1 end A1 gyr A96 (Nalr) thi hsd R17 (rk-mk+) glu V44 rel A1 lac. Der Originalstamm wurde von der Firma Stratagene bezogen.

2.1.10 Zelllinien

18-81 (Siden *et al.*, 1979)

Prä-B-Zelllinie, die aus murinem Knochenmark gewonnen und in dieser Arbeit für Proteinkinase-Studien sowie zur Überprüfung der Phosphospezifität generierter anti-*Ebf1*-Y(p)412-Antikörper verwendet wurde. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um einen μH-Ketten-positiven Klon, zur Verfügung gestellt von Dr. Hans-Martin-Jäck, Nikolaus-Fiebiger-Zentrum, Erlangen.

70Z/3 (Paige *et al.*, 1978)

Murine Prä-B-Zelllinie, die in dieser Arbeit für Proteinkinase-Studien verwendet wurde. Die Zelllinie wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Dirk Eick, HMGU München.

Ba/F3 (Palacios *et al.*, 1984 & 1985)

IL-3-abhängige Pro-B-Zelllinie, die aus murinem Knochenmark gewonnen wurde. Diese Zelllinie wurde in dieser Arbeit für Proteinkinase-Studien sowie für Luziferase-Reporter-Assays verwendet und wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolph Grosschedl, MPI Freiburg.

HEK293T (Graham *et al.*, 1977)

Transformierte Fibroblasten-ähnliche Zelllinie, die aus humanen embryonalen Nierenzellen gewonnen wurde und konstitutiv das *SV40 large T antigen* exprimiert. In dieser Arbeit wurde diese Zelllinie zur Vermehrung von Retroviren, basierend auf dem *Murine stem cell virus*, genutzt. Des Weiteren diente sie zur Überprüfung der Phosphospezifität generierter anti-Ebfl-Y(p)412-Antikörper, zu Lokalisationsstudien sowie der Herstellung von Positivkontrollen für Western Blot-Analysen. Die Zelllinie wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolph Grosschedl, MPI Freiburg.

GP+E86 (Markowitz *et al.*, 1988)

Fibroblasten-ähnliche Retrovirus-verpackende Zelllinie, welche aus Mausembryonen gewonnen wurde. Die Zelllinie enthält die *gag*-, *pol*- und *env*-Gene des *Moloney murine leukemia virus* und diente der Generierung von Helfer-freien rekombinanten Retroviren zur Transduktion muriner Zellen. Die Zelllinie wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Bohlander, Klinikum der Universität München-Großhadern.

WEHI-3B (Warner *et al.*, 1969)

Murine IL-3-produzierende, Makrophagen-ähnliche myelomonozytische Zelllinie. Der IL-3-haltige Überstand dieser Zelllinie wurde für die Kultivierung von Ba/F3-Zellen benötigt. Die Zelllinie wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Bohlander, Klinikum der Universität München-Großhadern.

2.1.11 Mausstämme

***Ebfl*^{-/-} (Lin & Grosschedl, 1995)**

Zur Generierung *Ebfl*-defizienter C57BL/6-Mäuse wurde ein funktionell essentieller Bereich der DNA-Bindedomäne durch eine *Neomycin*-Kassette ersetzt. Dieser Mausstamm trägt das Allogen *CD45.2* der Tyrosinphosphatase CD45.

C57BL/6 (Charles River, WIGA)

Dieser Mausstamm wurde zur Verpaarung der *Ebfl*-heterozygoten Mäuse verwendet, um ein Wildtyp-Allel zu erhalten. Des Weiteren diente er der Gewinnung primärer wt-Knochenmarks- und -Milzzellen. Dieser Mausstamm trägt das Allogen *CD45.2* der Tyrosinphosphatase CD45.

B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ (CD45.1; Charles River, WIGA)

Kongener C57BL/6-Mausstamm, der anstelle von *CD45.2* das Allogen *CD45.1* der Tyrosinphosphatase CD45 trägt. Diese Mäuse dienten als Empfängertiere in Transplantations-Experimenten.

2.1.12 Software

| Software | Funktion |
|---|---|
| 4Peaks 1.7.2 | Analyse von DNA-Sequenzen |
| Adobe Illustrator CS5 | Vektorzeichenprogramm |
| Adobe Photoshop CS5 | Bildbearbeitung |
| Analysis of Variance (ANOVA) Calculator (Scheffé, 1999; Soper, 2011) | Berechnung von Signifikanzwerten |
| BD FACSDiva Software | Aufnahme und Auswertung von Durchflusszytometrie und Zellsortierung |
| CELL Quest Becton Dickinson | Aufnahme und Auswertung von Durchflusszytometrie |
| ClustalW2, EMBL-EBI | Alignment von Nuklein- und Proteinsequenzen |
| DNA Strider 1.4f2 | Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen |
| Endnote X4 | Bibliographie |
| Epson Scanner Programm | Scannen von Western Blot-Analysen |
| FlowJo 9.3, Tree Star Inc. | Auswertung von Durchflusszytometrie und Zellsortierung |
| LightCycler® SYBR Green Software | Aufnahme und Auswertung quantitativer Realtime-PCR-Reaktionen |
| Microsoft Excel 2004 | Tabellen und Kalkulationen |
| Microsoft Word 2004 | Textverarbeitung |
| Primer3 | Primer-Design |
| Scaffold2 | Analyse von Protein-Sequenzierungen |

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden, die im Folgenden nicht weiter erläutert werden, wurden wie bei Sambrook & Russel (2001) beschrieben durchgeführt. Bei kommerziellen Produkten wurde, soweit nicht anders vermerkt, nach den Herstellerangaben vorgegangen.

2.2.1.1 RNA-präparative Techniken

2.2.1.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen wurden diese für 6 min bei 160 x g sedimentiert und anschließend in 1 ml peqGOLD TriFast™ (Peqlab) aufgenommen. Nach der Zugabe von 1 µl Glycogen (Fermentas) sowie 200 µl Chloroform (Sigma) und gründlichem Durchmischen der Reagenzien wurden die Proben für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Phasentrennung mittels Zentrifugation für 5 min bei 18.600 x g und 4 °C. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin befindliche Gesamt-RNA durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol für mindestens 20 min bei -20 °C gefällt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 10 min bei 18.600 x g und 4 °C wurde das RNA-Sediment mit 1 ml eiskaltem Ethanol (75 %) gewaschen, bei RT getrocknet und schließlich in 10-30 µl RNAase-freiem ddH₂O aufgenommen. Die so gewonnene RNA wurde nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung entweder direkt in die cDNA-Erststrang-Synthese eingesetzt (s. S. 51) oder bei -20 °C gelagert.

2.2.1.1.2 cDNA-Erststrang-Synthese mittels reverser Transkription

Die Synthese von Erststrang-cDNA erfolgte mithilfe der „SuperScript® II Reverse Transcriptase“ (Invitrogen Life Technologies). Hierzu wurden bis zu 2 µg Gesamt-RNA (s. S. 51), 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Invitrogen Life Technologies; 0,5 µg/µl) und 1 µl dNTPs (Fermentas; jeweils 10 mM) mit RNAase-freiem ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt, für 5 min bei 65 °C erhitzt und anschließend rasch auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 4 µl 5 x First Strand Buffer (Invitrogen Life Technologies), 2 µl DTT (Invitrogen Life Technologies; 0,1 M) sowie 1 µl RNasin® (Promega; 40 U/µl) wurde der Ansatz für 2 min bei 42 °C inkubiert und anschließend 1 µl „SuperScript® II Reverse Transcriptase“ (Invitrogen Life Technologies; 200 U/µl) hinzugegeben. Die reverse

Transkription erfolgte für 50 min bei 42 °C. Nach einer Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 min bei 70 °C wurde die gewonnene cDNA entweder direkt in die quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR; s. S. 52) eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.2.1.1.3 Quantitative Realtime-PCR

Die qRT-PCR wurde nach der „LightCycler-Methode“ nach Roche Diagnostics mithilfe der „LightCycler®480 SYBR Green I Master“-Reagenz (Roche Diagnostics) in Mikrotiter-Platten (Roche Diagnostics) durchgeführt. Für die LightCycler-Reaktion wurden 2 µl cDNA (s. S. 51), 5 µl „LightCycler®480 SYBR Green I Master“-Reagenz, 0,05 µl FP (5 pmol), 0,05 µl RP (5 pmol) und 2,9 µl ddH₂O gemischt. Verwendete Oligonukleotide (Metabion, s. S. 45) waren, soweit möglich, exonübergreifend, um Amplifikationsprodukte durch eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA zu vermeiden. Die Mikrotiterplatten wurden anschließend mittels einer Folie (Roche Diagnostics) verschlossen und die Fluoreszenzreaktion im LightCycler (Roche Diagnostics) mit folgender Temperaturabfolge in 45 Zyklen gemessen:

| Schritt | [°C] | [t] |
|--|----------|-------------|
| Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase | 95 | 10 min |
| Zyklische Denaturierung | 95 | 10 sec |
| Zyklische Hybridisierung | 62 | 10 sec |
| Zyklische Elongation | 72 | 15 sec |
| Erstellen der Schmelzkurve | 65-97 °C | 0,11 °C/sec |

Als Referenzgene zum Zweck der Normalisierung erhaltener Werte dienten *β-Aktin* bzw. *Hprt*. Zur Überprüfung der Spezifität amplifizierter Produkte wurden diese einer Schmelzkurven-Analyse unterzogen oder mittels Agarose-Gelelektrophorese (3 %iges Agarose-Gel) überprüft.

2.2.1.2 DNA-präparative Techniken

2.2.1.2.1 Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mithilfe des Kits „QIAGEN® Plasmid Midi Kit“ bzw. des „QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“ der Firma QIAGEN GmbH. Hierzu wurden 200 bzw. 400 ml einer Übernachtkultur der Bakterien angezogen. Die Isolierung erfolgte nach der Anleitung des Herstellers.

2.2.1.2.2 Isolierung genomicscher DNA aus Mausschwanzzellen

Zur Isolierung genomicscher DNA aus Mausschwanzzellen wurde den zu genotypisierenden Tieren ein etwa 0,3 cm großes Stück der Schwanzspitze entfernt und für mindestens 60 min in 100 µl Lysepuffer (1 x FirePol Puffer B (Solis BioDyne); 1,5 mM MgCl₂; 40 µg/ml Proteinase K (Roth)) bei 55 °C geschüttelt. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde der Ansatz anschließend für 15 min bei 95 °C geschüttelt. Zur Genotypisierung wurden von der gewonnenen genomicschen DNA 0,7 µl in die PCR-Reaktion eingesetzt (s. S. 53).

2.2.1.2.3 Maus-Genotypisierung

Die PCR-Reaktion zur Genotypisierung *Ebf1*-transgener Mäuse wurde nach folgendem Schema pipettiert:

| | |
|--|---------|
| Genomische Mausschwanz-DNA | 0,7 µl |
| 1 x FirePol Puffer B (Solis BioDyne) | 2,5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 0,5 µl |
| dNTPs (Fermentas; je 10 mM) | 2,6 µl |
| Ebf1 FP (100 pmol/µl) | 0,2 µl |
| Ebf1 RP (100 pmol/µl) | 0,2 µl |
| Ebf1 Neo RP (100 pmol/µl) | 0,2 µl |
| FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne; 5 U/µl) | 0,2 µl |
| ddH ₂ O | 18,1 µl |

Die Sequenzen verwendeter Oligonukleotide sind auf S. 46 aufgeführt.

Verwendetes PCR-Programm:

| Schritt | [°C] | [min] |
|--------------------------|------|-------|
| Initiale Denaturierung | 95 | 3 |
| | 80 | 3 |
| Zyklische Denaturierung | 95 | 0,5 |
| Zyklische Hybridisierung | 56 | 0,5 |
| Zyklische Elongation | 72 | 0,5 |
| 30 Zyklen | | |
| Finale Elongation | 72 | 5 |

Die PCR-Reaktion erfolgte in einer „DNA-Engine®“-PCR-Maschine der Firma BioRad.

2.2.1.2.4 Punktgerichtete Mutagenese

Zur Erzeugung von Punktmutationen wurde das Kit „Quik Change®, Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene verwendet. Hierbei wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen. Als Ausgangsvektoren dienten MSCV-*Ebf1*-IRES-Gfp, pCMV-*Ebf1* und pcDNA3.1-Flag-*Ebf1* (s. S. 47). Verwendete Oligonukleotide sind auf S. 46 aufgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einer „DNA-Engine®“-PCR-Maschine der Firma BioRad.

2.2.1.3 Protein-präparative Techniken

2.2.1.3.1 Proteinextraktion aus Säugerzellen für Western Blot-Analysen

Zur Extraktion von Proteinen aus Säugerzellen wurden bis zu 1×10^7 Zellen für 6 min bei $160 \times g$ sedimentiert und mit PBS (Gibco BRL) gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment je nach der Ausgangszellzahl in 100-500 µl Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 % Nonidet™ P40 Substitute (Sigma)) aufgenommen und für 40 min auf Eis lysiert. Um eine Degradation bzw. Dephosphorylierung der Proteine zu minimieren, wurden dem Lysepuffer Protease-Inhibitoren (Complete, Mini, EDTA-free Tabletten, Roche) bzw. Phosphatase-Inhibitoren (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten, Roche) nach der Anleitung des Herstellers zugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei $18.600 \times g$ und $4^\circ C$ wurde der Überstand für weiterführende Analysen verwendet oder ggf. bei $-20^\circ C$ gelagert.

2.2.1.3.2 Extraktion zytoplasmatischer und nukleärer Fraktionen aus HEK293T-Zellen

Zur Extraktion von zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen aus HEK293T-Zellen, wurden 2×10^7 Zellen für 6 min bei $160 \times g$ sedimentiert und mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde anschließend in $200 \mu l$ Puffer A (10 mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA) gelöst und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit $12,5 \mu l$ NonidetTM P40 Substitute (Sigma; 10 %) versetzt, welches spezifisch die Zellmembran aufbricht, die Kernmembran hingegen intakt lässt. Die Proben wurden für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit bei $4^\circ C$ geschüttelt. Anschließend wurden die Zellkerne für 10 min bei $18.600 \times g$ und $4^\circ C$ sedimentiert. Der Überstand, der die zytoplasmatische Fraktion enthält, wurde für weiterführende Analysen verwendet oder ggf. in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80^\circ C$ gelagert. Die sedimentierten Zellkerne wurden nochmals mit 1,5 ml Puffer A gewaschen, in $40 \mu l$ Puffer C (20 mM HEPES, pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA) aufgenommen und anschließend für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit bei $4^\circ C$ geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei $18.600 \times g$ und $4^\circ C$ wurde der Kernprotein-haltige Überstand für weiterführende Analysen verwendet oder ggf. in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80^\circ C$ gelagert.

2.2.1.3.3 Proteinextraktion aus Ba/F3-Zellen für Luziferase-Reporter-Assays

Zur Proteinextraktion aus Ba/F3-Zellen für Luziferase-Reporter-Assays (s. S. 60) wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion (s. S. 64) für 6 min bei $160 \times g$ sedimentiert und mit PBS (Gibco BRL) gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment in $100 \mu l$ Luziferase-Extraktionspuffer (10 % Glycerin; 1 % Triton X-100; 2 mM EDTA; 25 mM Tris/HCl, pH 7,8; 2 mM DTT (Invitrogen Life Technologies)) aufgenommen, für 15 min auf Eis lysiert und für 15 min bei $16.800 \times g$ und $4^\circ C$ sedimentiert. Der Überstand wurde anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80^\circ C$ gelagert.

2.2.1.3.4 *In vitro*-Translation von Proteinen

Zur *in vitro*-Translation rekombinanter Proteine mittels pBS-basierender Vektoren (s. S. 47) für Gelretardierungs-Analysen (s. S. 58) wurde das Kit „TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems“ der Firma Promega verwendet. Hierbei wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen.

2.2.1.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Messung

Zur Bestimmung der Konzentration extrahierter Proteine (s. S. 54-55) wurde das „Pierce® BCA Protein Assay Reagent“ der Firma Thermo SCIENTIFIC verwendet. Zunächst wurde Reagenz A mit Reagenz B im Verhältnis 50:1 gemischt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde BSA (PAA Laboratories) in den Konzentrationen 0, 2, 4, 8, 10 und 15 µg/µl in einem Gesamtvolumen von 400 µl Reagenz A/Reagenz B gelöst. Zur Bestimmung der Konzentration extrahierter Proteine wurde 1 µl der Proteinlösung mit 399 µl Reagenz A/Reagenz B gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt.

2.2.1.3.6 Phosphatase-Behandlung von Proteinextrakten

Zur Phosphatase-Behandlung von Proteinextrakten aus HEK293T- und 18-81-Zellen (s. S. 54) wurden 20 µg Gesamt-Protein mit 15 U „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“ (New England Biolabs; 10 U/µl) und 1 x NEBuffer3 (New England Biolabs) in einem Gesamtvolumen von 40 µl gemischt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen (s. S. 56).

2.2.1.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen nach Lämmli

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mithilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (1970). Hierzu wurde die entsprechende Proteinmenge (bis zu 20 µg) zunächst mit 5 x Lämmli-Puffer (4 % SDS; 20 % Glycerin; 250 mM Tris, pH 6,8; 5 % 2-Mercaptoethanol (Sigma); 0,01 % Bromphenolblau) versetzt und für 15 min bei 95 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Proteine mithilfe einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel setzte sich zusammen aus einem Sammelgel (250 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1 % SDS; 5 % Rotiphorese® Gel 40 (Roth; Acrylamid/Bisacrylamid 29:1); 0,1 % APS (Roth); 0,004 % TEMED (Roth)), das der Fokussierung der geladenen Proteine dient, und einem Trenngel (375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 % SDS; 10-12 % Rotiphorese® Gel 40; 0,1 % APS; 0,004 % TEMED), das die Auftrennung der Proteine ihrer molekularen Masse entsprechend ermöglicht. Als Protein-Längenstandard wurde der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ der Firma Fermentas mitgeführt. Der Gellauf erfolgte in einer mit 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 1 % SDS; 192 mM Glycin) gefüllten „Mini Trans-Blot® Cell“-Apparatur (Biorad) für 20 min bei 100 V und anschließend bei 160 V.

2.2.1.3.8 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot nach Towbin *et al.*, 1979)

Für Western Blot-Analysen wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine (s. S. 56) nach dem „*semi-dry*“-Verfahren in einer „Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell“-Apparatur (Biorad) auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran) transferiert. Dazu wurden vor dem Blotvorgang das Polyacrylamid-Gel, die Nitrozellulose-Membran sowie Gel-Blotting-Papiere (Whatman GmbH; 1,2 mm) in Transferpuffer (20 % Ethanol; 80 % 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 1 % SDS; 192 mM Glycin)) äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 10 V, 300 mA für 1,5 h. Zur Überprüfung des Protein-Transfers wurde die Nitrozellulose-Membran anschließend mit Ponceau S-Lösung (2 % Ponceau S (Roth); 30 % Trichloressigsäure; 30 % Sulfosalicylsäure) gefärbt. Für die Immundetektion von Proteinen wurde die Nitrozellulose-Membran zunächst in Wasser und dann solange in 5 % Milchpulver-Lösung (1 x PBS; 5 % Trockenmilchpulver; 0,4 % Tween®20) gewaschen, bis die Ponceau S-Färbung entfernt war.

2.2.1.3.9 Immundetektion von Proteinen

Der Nachweis der auf die Nitrozellulose-Membran transferierten Proteine (s. S. 57) erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Vor der Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit dem Erstantikörper wurde diese für zunächst für 20 min mit 5 % Milchpulver-Lösung (1 x PBS; 5 % Trockenmilchpulver; 0,4 % Tween®20) unter leichtem Schütteln inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper während der Immundetektion zu minimieren.

Die Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C in entsprechender Verdünnung (s. S. 43). Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit 1 x PBS + 0,4 % Tween®20 bzw. 1 x TBS + 0,4 % Tween®20, entsprechend der für den Erstantikörper verwendeten Lösung, gewaschen und für 45 min bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert, welcher in einer dem Erstantikörper entsprechenden Lösung verdünnt wurde (s. S. 43). Nach drei Waschschritten für jeweils 10 min mit 1 x PBS + 0,4 % Tween®20 bzw. 1 x TBS + 0,4 % Tween®20 wurde die Chemilumineszenz-Reaktion mittels ECL-Detektionsreagenz (s. unten) angeregt, die Nitrozellulose-Membran auf einen lichtsensitiven Film („Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive“; CEA GmbH) aufgelegt und dieser in einer Röntgenfilmentwicklermaschine (TYPON Optimax; Raymed Imaging AG) entwickelt. Die Immundetektion unter Verwendung des „Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10®“-Antikörpers (Millipore) erfolgte nach den Herstellerangaben.

ECL-Detektionsreagenz:

1 ml Reagenz A (0,1 M Tris/HCl, pH 8,6; 0,25 mg/ml Luminol sodium salt (Sigma))
100 µl Reagenz B (DMSO (Roth); 1,1 mg/ml ρ -Coumaric acid (Sigma))
0,3 µl Reagenz C (H_2O_2 (30 %)))

Um die Nitrozellulose-Membran ggf. einer weiteren Immundetektion zu unterziehen, wurde diese für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln mit *Stripping*-Puffer (100 mM Glycin; 1 % SDS; 0,1 % Nonidet™ P40 Substitute (Sigma)) inkubiert, um die ECL-Detektionsreagenz sowie die Erst- und Zweitantikörper zu entfernen. Nach drei Waschschritten mit 1 x PBS + 0,4 % Tween®20 bzw. 1 x TBS + 0,4 % Tween®20 für jeweils 10 min und einer Inkubation für 20 min mit 5 % Milchpulver-Lösung (1 x PBS; 5 % Trockenmilchpulver; 0,4 % Tween®20) erfolgte die erneute Immundetektion mit den entsprechenden Erst- und Zweitantikörpern.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Gelretardierung

2.2.2.1.1 Anlagerung des Oligonukleotids

Zur Anlagerung komplementärer Oligonukleotide (s. S. 46) wurden equimolare Mengen (250 ng/µl) der beiden Einzelstränge in *Annealing*-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl) gemischt und für 10 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Anschließend wurde dieser ausgeschaltet und die Proben bis zum Erreichen von RT darin inkubiert. Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden daraufhin radioaktiv markiert (s. S. 58) oder ggf. bei -20 °C gelagert.

2.2.2.1.2 Radioaktive Markierung des Oligonukleotids

Die doppelsträngigen Oligonukleotide (s. S. 58) wiesen Guanosin-haltige 5'-Überhänge auf, welche mithilfe des „Klenow Fragment“ (Roche Diagnostics) unter Verwendung von ³²P-alpha-dCTP radioaktiv markiert wurden. Hierzu wurden 2 µl Oligonukleotid (25 ng/µl), 2 µl „Klenow Fragment“ (Roche Diagnostics; 2 U/µl), 2 µl NEB2-Puffer (New England Biolabs; 10 x), 5 µl ³²P-alpha-dCTP (Hartmann Analytic; 3000 Ci/mol), 2 µl dNTPs (dATP, dGTP, dTTP; je 500 µM; Fermentas) und 7 µl ddH₂O für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Oligonukleotid mithilfe einer „Sephadex® G50 Säule“ (Pharmacia) gereinigt, in

TE-Puffer (10 mM Tris-Base, pH 8; 1 mM EDTA) aufgenommen und die Markierung mittels eines Szintillationszählers (BioScan, Inc.) überprüft. Zur Herstellung nicht radioaktiv markierter Oligonukleotide wurden 1 µl Oligonukleotid (250 ng/µl), 2 µl „Klenow Fragment“ (2 U/µl), 2 µl NEB2-Puffer (10 x), 2 µl dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 500 µM) und 13 µl ddH₂O für 60 min bei 37 °C inkubiert. Markierte Oligonukleotide wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.2.1.3 Bindereaktion von Proteinen an die radioaktiv markierten Oligonukleotide

Um die Bindung von Proteinen an die radioaktiv markierten Oligonukleotide (s. S. 58) zu untersuchen, wurden 18 µg Protein aus HEK293T-Zelllysaten (s. S. 54) bzw. 10 µl der *in vitro*-translatierten Proteine (s. S. 55) mit 5 µl 4 x Bindepuffer (10 mM HEPES, pH 7,9; 70 mM KCl; 1 mM DTT (Invitrogen Life Technologies); 4 % Glycerin; 1 mM EDTA; 2,5 mM MgCl₂, 2 µl Poly(dI-dC) (1 mg/ml; Sigma), 2 µl BSA (PAA Laboratories; 1 mg/ml) und ggf. 2 µl „Anti-FLAG® M2 Monoclonal Antibody“ (Sigma) in einem Gesamtvolumen von bis zu 16 µl für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 µl radioaktiv markiertes Oligonukleotid und ggf. 2 µl nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid zum Zweck der Kompetition zugegeben und die Gesamtreaktion mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Die Proben wurden für 30 min bei RT inkubiert und anschließend auf ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen (s. S. 59).

2.2.2.1.4 Gellauf

Mittels eines nativen, mit 1 x TBE (pH 8,3) überschichteten Polyacrylamid-Gels (4 % Rotiphorese® Gel 40 (Roth; Acrylamid/Bisacrylamid 29:1); 0,5 x TBE, pH 8,3; 0,1 % APS (Roth); 0,002 % TEMED (Roth)) wurden die Komplexe aus Proteinen, DNA und ggf. Antikörpern (s. S. 59) im elektrischen Feld bei 130 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Polyacrylamid-Gel mithilfe eines Geltrockners (BioRad) für 60 min unter Vakuum und Wärmeeinwirkung (80 °C) auf einem Gel-Blotting-Papier (Whatman GmbH; 0,34 mm) getrocknet, auf einen lichtsensitiven Film („Kodak BioMax MS Film“, Sigma) aufgelegt und dieser in einer Röntgenfilmentwicklermaschine (TYPON Optimax, Raymed Imaging AG) entwickelt.

2.2.2.2 Luziferase-Reporter-Assay

2.2.2.2.1 Luziferase-Messung

Zur Messung der Luziferase-Aktivität wurden von den Ba/F3-Zellextrakten (s. S. 55) jeweils 10 µl auf eine Mikrotiterplatte (Lumitrac 200; USA Scientific) vorgelegt. Nach der Zugabe von jeweils 50 µl Luziferase-Assay-Puffer (20 mM Tricin; 1,07 mM Magnesiumcarbonat-Pentahydrat; 2,67 mM Mg₂SO₄; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT (Invitrogen Life Technologies); 270 µM Acetyl-Coenzyme A (Roche Diagnostics); 470 µM D(-)-Luciferin (Roche Diagnostics); 530 µM ATP disodium salt (Roche Diagnostics)) erfolgte die Messung der Biolumineszenz mittels eines Luminometers (Berthold Detection Systems) bei einer Wellenlänge von 560 nm. Die Messung wurde jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Luziferase-Aktivität wurde mittels Normalisierung auf die β-Galaktosidase-Aktivität (s. S. 60) kalkuliert.

2.2.2.2.2 β-Galaktosidase-Messung

Zur Messung der β-Galaktosidase-Aktivität wurden von den Ba/F3-Zellextrakten (s. S. 55) ebenfalls jeweils 10 µl auf eine Mikrotiterplatte (Lumitrac 200; USA Scientific) vorgelegt. Nach der Zugabe von jeweils 100 µl β-Galaktosidase-Assay-Puffer (100 mM Na-P, pH 8; 1 % Galacton-Plus® Chemiluminescent Substrate for β-Galactosidase (Applied Biosystems); 1 mM MgCl₂) und einer 15-minütigen Inkubation bei RT erfolgte die Messung durch Zugabe von jeweils 50 µl β-Galaktosidase-Verstärkungspuffer (0,2 M NaOH; 10 % Emerald™ Enhancer (Applied Biosystems)) mittels eines Luminometers (Berthold Detection Systems) bei einer Wellenlänge von 475 nm. Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten.

2.2.3 Zellkultur

2.2.3.1 Allgemeine Zellkultur-Techniken

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Zellkulturarbeiten fanden unter einer Umluft-Sterilbank (Thermo Electron Corporation) statt und wurden unter Verwendung steriler Lösungen sowie Einweg-Pipetten (Corning Incorporated) durchgeführt. Die Zellen wurden in den jeweiligen Zellen angepassten Medien in einem CO₂-Inkubator (Binder) bei 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Adhäsente Zellen sowie Suspensionszellen wurden alle 3-4 Tage neu passagiert. Falls nicht anders vermerkt, wurden Zellen in

Zentrifugationsschritten für 6 min bei 160 x g sedimentiert. Sämtliche Waschschrifte erfolgten in sterilem PBS (Gibco BRL).

2.2.3.2 Kulturmedien für Zelllinien

18-81 und 70Z/3:

| | |
|---|--------|
| RPMI 1640 (Gibco BRL) | |
| Hitzeinaktiviertes FCS (PAA Laboratories) | 10 % |
| Sodium Pyruvate (100 mM; Gibco BRL) | 1 % |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml & 10.000 µg/ml; Gibco BRL) | 1 % |
| 2-Mercaptoethanol (Sigma) | 500 µM |

Ba/F3:

| | |
|---|------|
| RPMI 1640 (Gibco BRL) | |
| Hitzeinaktiviertes FCS (PAA Laboratories) | 10 % |
| Filtrierter IL-3-haltiger WEHI-3B-Überstand | 10 % |
| L-Glutamine, 200 mM (100 x; Gibco BRL) | 1 % |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml & 10.000 µg/ml; Gibco BRL) | 1 % |

HEK293T und GP+E86:

| | |
|---|------|
| DMEM (Gibco BRL) | |
| Hitzeinaktiviertes FCS (PAA Laboratories) | 10 % |
| L-Glutamine, 200 mM (100 x; Gibco BRL) | 1 % |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml & 10.000 µg/ml; Gibco BRL) | 1 % |

WEHI-3B:

| | |
|---|------|
| RPMI 1640 (Gibco BRL) | |
| Hitzeinaktiviertes FCS (PAA Laboratories) | 10 % |

2.2.3.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte mithilfe des „CASY TTC“-Zellzahl-Messgerätes (Innovatis) nach der Anleitung des Herstellers.

2.2.3.4 Ablösen adhärenter Zellen

Adhärente Zelllinien (HEK293T und GP+E86) wurden zum Passagieren, Ernten oder Einfrieren durch kurzzeitige Behandlung mit dem proteolytischen Enzym Trypsin (Trypsin-EDTA; 0,05 %; Gibco BRL) in Suspension gebracht. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit steriles PBS gewaschen und anschließend mit 37 °C warmem Trypsin für 2-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde anschließend mit dem fünffachen Volumen des jeweiligen Kulturmediums gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen entweder zur weiteren Kultivierung oder für weiterführende Analysen verwendet.

2.2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Adhärente Zellen sowie Suspensionszellen wurden einen Tag vor dem Einfrieren mit frischem Medium gefüttert. Zum Einfrieren wurde eine Einzelzellsuspension der Zellen sedimentiert und in kaltem Einfriermedium (90 % hitzeinaktiviertes FCS (PAA Laboratories); 10 % DMSO (Roth)) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zunächst in Einfrier-Röhrchen (Cryo Tube™ Vials; Nunc GmbH) bei -80 °C eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Um ein langsames, kontinuierliches Einfrieren zu gewährleisten, wurden die Zellen hierbei in mit Isopropanol gefüllte Einfrier-Behälter gestellt (Nalgene, USA).

Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37 °C erwärmt und in einem 10 x Volumen des entsprechenden Kulturmediums aufgenommen. Zum Entfernen des DMSOs wurden die Zellen sedimentiert und in neuem Medium aufgenommen.

2.2.3.6 IL-7-Stimulation muriner B-Zelllinien

Zur Analyse der Ebfl-Y412-Phosphorylierungsmenge in Abhängigkeit IL-7-vermittelter Signalübertragung wurden verschiedene B-Zelllinien (Ba/F3, 70Z/3, 18-81) *in vitro* durch rekombinantes IL-7 (R&D Systems) stimuliert. 4 h vor IL-7-Zugabe (10 ng/ml) wurde den Zellen frisches Kulturmedium (s. S. 61) zugegeben ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml). 24 h nach der IL-7-

Zugabe erfolgte die Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie (s. S. 68).

2.2.3.7 Behandlung muriner B-Zelllinien mit Kinase-Inhibitoren

Zur Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Abhängigkeit Jak/Stat-vermittelter Signalübertragung wurden Ba/F3-Zellen 2 h vor Zugabe des Jak-Inhibitors TG101348 (1000 nM; Symansis) mit frischem Kulturmedium (s. S. 61) gefüttert ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml). 24 h nach der Inhibitor-Zugabe wurden die Zellen mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie bezüglich der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge analysiert (s. S. 68).

Zur Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Abhängigkeit der Btk-Aktivität wurden 18-81-Zellen 2 h vor Zugabe des Btk-Inhibitors LFM-A13 (CalBiochem) frisches Kulturmedium (s. S. 61) zugegeben ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml). Der Inhibitor wurde hierbei in verschiedenen Konzentrationen (20 µM, 100 µM, 300 µM; gelöst in DMSO) verwendet. 4 h nach der Zugabe des Inhibitors wurden Proteinextrakte der 18-81-Zellen für Western Blot-Analysen hergestellt. (s. S. 54).

2.2.3.8 Transiente Transfektion von Säugerzellen

2.2.3.8.1 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen mittels PEI

Zur transienten Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung von Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen, zu Lokalisationsstudien, zur Analyse der Phosphospezifität generierter anti-Ebf1-Y(p)412-Antikörper und zur Herstellung von Positivkontrollen für Western Blot-Analysen wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion definiert ausgesät ($7,5 \times 10^5$ Zellen je 10 cm-Zellkulturschale). Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen in 3 ml DMEM (Gibco BRL) + 1 % hitzeinaktiviertes FCS (PAA Laboratories) kultiviert. Währenddessen wurden 6 µg der zu transfizierenden DNA sowie ggf. 2 µg Helfer-Plasmid zur Herstellung von Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen in 300 µl OptiMEM® (Gibco BRL) aufgenommen. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden je Transfektionsansatz 300 µl OptiMEM® mit 12 µl Polyethylenimin (PEI; 1 mg/ml; Gibco BRL) gemischt. Beide Ansätze wurden gründlich miteinander vermischt und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA/OptiMEM®/PEI-Lösung tropfenweise auf die HEK293T-Zellen gegeben und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium durch Kulturmedium ersetzt und die Zellen für weitere 44 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.8.2 Transiente Transfektion von Ba/F3-Zellen mittels Elektroporation

Zur transienten Transfektion von Ba/F3-Zellen für Luziferase-Reporter-Assays (s. S. 60) sowie Ebf-Zielgen-Studien wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion mit frischem Medium gefüttert. Unmittelbar vor der Transfektion wurden 1×10^7 Zellen/Transfektion sedimentiert, dreimal mit RPMI 1640 (Gibco BRL) gewaschen, in 300 µl OptiMEM® (Gibco BRL) aufgenommen und schließlich in eine Elektroporationsküvette (Brand) überführt. Je Transfektion wurden bis zu 20 µg der entsprechenden Plasmide hinzugegeben (siehe unten). Die Elektroporation erfolgte in einem Elektroporationssystem (Gene Pulser® II, BioRad) bei 320 V und 975 µF. Transfizierte Zellen wurden anschließend sofort in 2 ml 37 °C warmes Kulturmedium überführt und für 48 h bei 37 °C inkubiert.

Je Transfektionsansatz wurden von den Vektoren pCMV-mock, pCMV-Ebf1, -Ebf1-Y412F, -Ebf1-Y412D, -Ebf2, -Ebf3, -Ebf4 und -E47 jeweils 20 µg, von pBL-Lambda5-Luc bzw. dem pBL-Leervektor 10 µg und dem pCMV-LacZ-Vektor 2 µg eingesetzt.

2.2.3.9 Herstellung von Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen und retrovirale Transduktion muriner Zellen

2.2.3.9.1 Herstellung von Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen

Zur Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen wurden zunächst HEK293T-Zellen mittels PEI transfiziert (s. S. 63). Dies diente der Herstellung von Retroviren, basierend auf dem *Murine stem cell virus* (MSCV). Hierzu wurden die Zellen mit 6 µg des Vektors MCSV-mock-, -Ebf1-, -Ebf1-Y412F-, -Ebf2-, -Ebf3- oder -Ebf4-IRES-Gfp sowie 2 µg eines Helfer-Plasmids transfiziert (s. S. 47). Dieses Helfer-Plasmid trägt die für die Replikation und Viruspartikelbildung erforderlichen *gag*-, *pol*- und *env*-Gene.

48 h nach der Transfektion wurde der Viruspartikel-haltige Zellkulturerstand der HEK293T-Zellen durch einen Spritzenfilter steril filtriert (Millipore; 0,22 µm) und auf die zu etwa 20-30 % konfluent wachsende Zelllinie GP+E86 gegeben. Zur Erhöhung der Infektionseffizienz wurden des Weiteren 6 µg/ml Polybren (Sigma) auf die GP+E86-Zellen gegeben. Dieser Vorgang wurde 4-6 x alle 8-12 h wiederholt.

Um einen möglichst hohen Virustiter zu erreichen, wurden die infizierten GP+E86-Zellen, basierend auf der Expression von *Gfp*, 2-3 x mittels Durchfluszytometrie sortiert (s. S. 69). Sortierte Zellen wiesen nun eine genomische Integration des Gens von Interesse auf. Durch das Vorhandensein der *gag*-, *pol*- und *env*-Gene des *Moloney murine leukemia virus* im

Genom der GP+E86-Zellen werden Helfer-freie rekombinante Retroviren permanent in den Zellkulturüberstand abgegeben, welcher wiederum zur Transduktion muriner Zellen diente (s. S. 65).

2.2.3.9.2 Retrovirale Transduktion muriner Zellen

Zur retroviralen Transduktion muriner Zellen (Fötale Leberzellen, 18-81) wurden 2×10^6 der zu transduzierenden Zellen auf die in einer 10 cm-Kulturschale zu etwa 70 % konfluent wachsenden GP+E86-Zellen gegeben (s. S. 64). Die Transduktion erfolgte in dem Kulturmedium, das den zu transduzierenden Zellen angepasst war (s. S. 61 und S. 65), für 48 h unter Zugabe von 6 µg/ml Polybren (Sigma). Den Kokulturen mit fötalen Leberzellen wurden des Weiteren 10 ng/ml IL-3, 5 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml SCF (R&D Systems) zugegeben.

Zur Transduktion fötaler Leberzellen wurden die GP+E86-Zellen 24 h vor Beginn der Kokultur mittels γ -Strahlung (2500 rad) in einer Bestrahlungsanlage (Gammacell 40; MDS Nordion) bestrahlt.

Die Bestimmung der Transduktionsrate muriner Zellen erfolgte nach 48 h mittels Durchflusszytometrie-basierter Analyse der *Gfp*-Expression am FACSCaliburTM Flow Cytometer (BD Biosciences; s. S. 68). Transduzierte fötale Leberzellen wurden anschließend für Analysen des *in vitro*- bzw. *in vivo*-B-Zell-Differenzierungs-Potentials verwendet (s. S. 66 und S. 67).

2.2.4 Mausanalysen

2.2.4.1 Mauskreuzungen

Zur Isolierung *Ebf1*-defizienter fötaler Leberzellen (s. S. 65) wurden *Ebf1*-heterozygote Tiere gekreuzt und am Tag 16,5 - 17,5 der Embryonalentwicklung (E16,5 - E17,5) die Embryonen aus dem Muttertier präpariert. Die Genotypisierung *Ebf1*-transgener Mäuse erfolgte wie auf S. 53 beschrieben.

2.2.4.2 Isolierung von Organen und Zellen aus der Maus

2.2.4.2.1 Isolierung fötaler Leberzellen aus Mausembryonen

Zur Isolierung fötaler Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mausembryonen (E16,5 - E17,5) wurde die fötale Leber als ganzes Organ isoliert. Um lymphatische Einzelzellen aus dem

Gewebeverbund zu lösen, wurde das Gewebe durch ein 70 µm Nylon-Sieb (BD GmbH) gedrückt und in Kulturmedium aufgenommen (RPMI 1640 (Gibco BRL); 10 % hitzeinaktiviertes FCS (PAA Laboratories); 5 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml & 10.000 µg/ml; Gibco BRL)). Anschließend wurden die fötalen Leberzellen mittels Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen transduziert (s. S. 65) und zu Analysen des *in vitro*- (s. S. 66) und *in vivo*-B-Zell-Differenzierungs-Potentials verwendet (s. S. 67).

2.2.4.2.2 Isolierung von murinen Knochenmarks- und Milzzellen

Zur Isolierung von Knochenmarks- und Milzzellen aus 3-24 Wochen alten Mäusen wurden Femur und Tibia der Hinterbeine sowie die Milz als ganzes Organ präpariert. Anschließend wurden die Knochen angeschnitten und mittels einer Kanüle (0,4 x 20 mm, 27G x 3/4'', Größe 20; Braun) mit sterilem PBS oder zur Verwendung für Whitlock-Witte-Kulturen direkt mit Kulturmedium gespült (s. S. 66). Zur Herstellung von Einzelzellsuspension wurde das isolierte Knochenmark sowie die Milz schließlich durch ein 70 µm Nylon-Sieb (BD GmbH) gedrückt. Isolierte Milzzellen wurden in sterilem PBS aufgenommen.

2.2.4.2.3 Herstellung von Whitlock-Witte-Kulturen aus murinen Knochenmarkszellen und Kokultivierung mit transduzierten fötalen Leberzellen (*in vitro*-B-Zell-Differenzierung)

Die Herstellung so genannter Whitlock-Witte-Kulturen aus murinen Knochenmarkszellen erfolgte in Anlehnung an Whitlock & Witte (1982). Hierbei handelt es sich um ein Langzeit-B-Zell-Kultursystem, das zu Analysen des *in vitro*-B-Zell-Differenzierungs-Potentials transduzierter *Ebf1*-defizienter fötaler Leberzellen diente.

Zur Etablierung eines stromalen *Feeder-Layers* wurden zunächst $13,5 \times 10^6$ Knochenmarkszellen 4-24 Wochen alter CD45.1-Mäuse (s. S. 49) je 10 cm-Kulturschale in Kulturmedium (RPMI 1640 (Gibco BRL); 10 % hitzeinaktiviertes FCS (PAN Biotech); 5 x 10^{-5} M 2-Mercaptoethanol (Sigma)) aufgenommen und bei 37 °C inkubiert. Nach einer Kultivierung der isolierten Knochenmarkszellen für 24 h erfolgte die Zugabe von 2×10^6 transduzierten fötalen Leberzellen (CD45.2; s. S. 65), die zuvor mit sterilem PBS gewaschen wurden. Durch die Kokultivierung der fötalen Leberzellen mit dem stromalen *Feeder-Layer* wird die B-Zell-Differenzierung hämatopoietischer Zellen ermöglicht. Die Analyse der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung erfolgte nach 10-14 Tagen mittels Färbung mit B-Zell-

spezifischen FACS-Antikörpern am FACSCaliburTM Flow Cytometer (BD Biosciences; s. S. 68). Während dieses Zeitraumes wurde alle 3-4 Tage ein partieller Medienwechsel durchgeführt. Hierbei wurden abweichend von der von Whitlock & Witte beschriebenen Methode bei jedem Medienwechsel 4 ml des Kulturmediums entfernt und durch 5 ml frisches Kulturmedium ersetzt.

2.2.4.3 Hämatopoietische Rekonstitution von CD45.1-Mäusen

Zur Analyse des *in vivo*-B-Zell-Differenzierungs-Potentials transduzierter *Ebf1*-defizienter fötaler Leberzellen wurden diese nach der Transduktion durch Kokultivierung mit GP+E86-Zellen für 48 h (s. S. 65) in letal bestrahlte CD45.1-Mäuse injiziert (s. S. 67).

2.2.4.3.1 Bestrahlung von CD45.1-Mäusen und intravenöse Injektion transduzierter fötaler Leberzellen

Als Empfängertiere für Transplantationen transduzierter *Ebf1*-defizienter fötaler Leberzellen dienten 8-12 Wochen alte CD45.1-Mäuse (s. S. 49). 4-8 h vor der Injektion wurden die Empfängertiere mittels γ -Strahlung (820 rad) in einer Bestrahlungsanlage (Gammacell 40; MDS Nordion) letal bestrahlt. Als Vorbereitung für die Injektion wurden transduzierte fötale Leberzellen (s. S. 65) zunächst dreimal mit sterilem PBS gewaschen und schließlich $7,5 \times 10^5$ Zellen in einem Gesamtvolumen von 300 μ l sterilem PBS zusammen mit $2,5 \times 10^5$ CD45.1-Kompetitor-Zellen in die Schwanzvene einer bestrahlten Maus injiziert. Zur Gewinnung der Kompetitor-Zellen wurde unmittelbar vor der Transplantation Gesamt-Knochenmark aus 8-12 Wochen alten CD45.1-Mäusen isoliert (s. S. 66).

2.2.4.3.2 Analyse rekonstituierter Mäuse

4-6 Wochen nach der Rekonstitution bestrahlter Empfängertiere mit transduzierten *Ebf1*-defizienten fötalen Leberzellen (s. S. 67) wurde das *in vivo*-B-Zell-Differenzierungs-Potential dieser Zellen analysiert. Hierzu wurde Gesamt-Knochenmark aus Femur und Tiba der Hinterbeine der Empfängertiere isoliert (s. S. 66), mit B-Zell-spezifischen FACS-Antikörpern gefärbt und schließlich mittels Durchflusszytometrie am FACSCaliburTM Flow Cytometer (BD Biosciences) oder FACSariaTMIII (BD Biosciences) analysiert (s. S. 68).

2.2.5 Durchflusszytometrie und Zellsortierung

2.2.5.1 Durchflusszytometrie

Für die Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie wurden Einzelzellsuspensionen in PBS hergestellt und bis zu 2×10^7 Zellen zunächst für 20 min mit einem Fc-Block-Antikörper (CD16/CD32 (Fc γ III/II Rezeptor); BD Pharmingen) inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen für 20-30 min mit einer Kombination aus APC-, eFluor®450-, FITC-, PE- und PerCP-Cy5.5-konjugierten bzw. biotinylierten monoklonalen Antikörpern gegen diverse Oberflächenmarker der Zellen gefärbt. Verwendete Konzentrationen sämtlicher Antikörper sind auf S. 44 aufgeführt.

Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und zur Analyse in einem der Zellzahl entsprechenden Volumen PBS aufgenommen. Um tote Zellen anzufärben, wurde ggf. wenige Minuten vor der Analyse der Zellen am FACSCalibur™ Flow Cytometer (BD Biosciences) oder FACSaria™III (BD Biosciences) 0,01 mg/ml Propidium-Iodid (Applichem) hinzugegeben. Die Aufnahme und Auswertung der Analysen erfolgte mithilfe der Software-Programme „BD FACSDiva Software“ (Becton Dickinson), „CELL Quest Becton Dickinson“ (Becton Dickinson) und „FlowJo 9.3“ (Tree Star Inc.).

Die Bestimmung der Transduktionsraten muriner Zellen (s. S. 65) erfolgte durch Analyse der *Gfp*-Expression in diesen Zellen. Transduzierte fötale Leberzellen wurden zusätzlich durch den anti-CD45.2-Antikörper gefärbt.

Zur Analyse der *in vitro*- (s. S. 66) und *in vivo*-B-Zell-Differenzierung (s. S. 67) wurden die Zellen mit einer Kombination aus anti-B220, anti-CD19 und anti-CD45.2-Antikörpern gefärbt.

2.2.5.2 Intrazelluläre Durchflusszytometrie

Der intrazelluläre Nachweis von Ebf1-Y412 und Ebf1-Y(p)412 mittels der Erstantikörper anti-Ebfl-Y412, Klon 3G5, sowie anti-Ebfl-Y(p)412, Klon 1A5 (Dr. E. Kremmer, HMGU München), erfolgte mithilfe des „BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit“ (Becton Dickinson) nach der Anleitung des Herstellers. Als Ausgangszellzahl wurden bis zu 2×10^6 Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Antikörper wurden wie auf S. 45 beschrieben verdünnt. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgte die Fixierung/Permeabilisierung der Zellen für 60 min und eine Inkubation mit dem Erst- sowie Zweitantikörper (F(ab')2 Anti-Mouse IgG PE; eBioscience) bei RT. Gefärbte Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie am FACSCalibur™ Flow Cytometer (BD Biosciences) analysiert. Die Auswertung erfolgte

mithilfe der „CELL Quest Becton Dickinson“-Software. Prozentuale Unterschiede in der Fluoreszenz-Intensität zweier Zellpopulationen wurden hierbei durch Subtraktion der Zellpopulation mit der geringeren Fluoreszenz-Intensität mithilfe dieser Software errechnet.

2.2.5.3 Zellsortierung

2.2.5.3.1 Isolierung von Hardy-B-Zell-Fraktionen

Zur Isolierung der verschiedenen B-Zell-Fraktionen nach Li, Hayakawa & Hardy (1993) aus murinen wt-Knochenmarks- oder -Milzzellsuspensionen (s. S. 66) wurden bis zu 2×10^7 Zellen dieser Organe in Einzelzellsuspension gebracht und mit einer Kombination verschiedener B-Zell-Oberflächenmarker gefärbt (s. S. 44). Fraktionen A - D wurden aus dem Knochenmark isoliert, während Fraktionen E und F aus der Milz gewonnen wurden. Zur Isolierung der Fraktionen A - C wurden die Antikörper anti-B220-, anti-CD43-, anti-BP-1- und anti-CD24 verwendet, zur Gewinnung der Fraktionen D-F hingegen eine Kombination aus anti-B220-, anti-CD43-, anti-IgM- und anti-IgD-Antikörpern. Die jeweiligen B-Zell-Fraktionen wurden direkt in PBS sortiert und anschließend für 6 min bei $160 \times g$ sedimentiert. Für Western Blot-Analysen wurden das Zellsediment in $40 \mu\text{l}$ Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 % NonidetTM P40 Substitute (Sigma)) aufgenommen und unter Verwendung von Protease-Inhibitoren (Complete, Mini, EDTA-free Tabletten, Roche) sowie Phosphatase-Inhibitoren (Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten, Roche) für 40 min auf Eis lysiert. So gewonnene Protein-Lysate wurden bis zum Auftragen auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel (s. S. 56) bei -20°C gelagert. Die Analyse der B-Zell-Fraktionen mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie erfolgte wie auf S. 68 beschrieben.

2.2.5.3.2 Anreicherung GFP-positiver Zellen zur Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen

Zur Erhöhung des Virustiters wurden infizierte Retrovirus-verpackende GP+E86-Zellen (s. S. 64), basierend auf der Expression von *Gfp*, 2 - 3 x mittels Durchflusszytometrie sortiert. Hierzu wurden bei jeder Sortierung die Zellen mit der höchsten *Gfp*-Expression (etwa 10 % der Zellpopulation) direkt in Kulturmedium (s. S. 61) sortiert, anschließend für 6 min bei $160 \times g$ sedimentiert und schließlich in neuem Kulturmedium bei 37°C kultiviert.

2.2.6 Statistik

In Balkendiagrammen dargestellte Mittelwerte und deren Standardabweichungen wurden mittels des Programms „Microsoft Excel 2004“ berechnet. Signifikanzwerte (P) wurden bei biologischen Triplikaten angegeben und mithilfe der Software „Analysis of Variance (ANOVA) Calculator“ ermittelt (Scheffé, 1999; Soper, 2011). qRT-PCR-Analysen wurden je Replikat als technisches Triplikat, Luziferase-Reporter-Assays als technisches Duplikat gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Regulation der B-Zell-Differenzierung anhand posttranslationaler Modifikationen von Ebf1

3.1.1. Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung

3.1.1.1 Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung in HEK293T- und 18-81-Zellen mittels eines neu generierten Ebf1-Y(p)412-spezifischen Antikörpers

Um die mittels Massenspektrometrie in HEK293T- und 18-81-Zellen identifizierte Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstelle (s. S. 27) zu bestätigen sowie zu deren weitergehenden Charakterisierung wurden von Dr. Elisabeth Kremmer (HMGU München) mithilfe des synthetischen Peptids EALY(p)SVPRNHC monoklonale Antikörper in der Maus generiert, welche spezifisch phosphoryliertes Ebf1-Y412 erkennen sollen (Abbildung 3.1A). Aus Löslichkeitsgründen sowie um die Präferenz der Phosphoaminoäure hervorzuheben, wurde der Peptidsequenz C-terminal ein Cystein angefügt.

Die so generierten Antikörper wurden anschließend bezüglich ihrer Phosphospezifität analysiert. Hierzu wurden Protein-Extrakte der Prä-B-Zelllinie 18-81, die endogen *Ebf1* exprimiert, einer Behandlung mit der Phosphatase „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“ (CIP) unterzogen und anschließend unter Verwendung generierter Antikörper im Western Blot analysiert (Abbildung 3.1B + C). Abbildung 3.1B zeigt eine Übersicht über die Phosphospezifität generierter funktioneller Antikörper. Von insgesamt 30 analysierten Antikörpern erwiesen sich 17 im Western Blot als funktionell. Davon erkannten 8 Antikörper präferenziell phosphoryliertes Ebf1-Y412 (Ebf1-Y(p)412) und 6 Antikörper präferenziell nicht phosphoryliertes Ebf1-Y412 (Ebf1-Y(n.p)412), während 3 Antikörper keine Präferenz zeigten (Ebf1-Y412). In Abbildung 3.1C dargestellt sind repräsentative Western Blot-Analysen der CIP-behandelten Protein-Extrakte aus 18-81-Zellen unter Verwendung ausgewählter Antikörper. Die Phosphospezifität wurde durch den Vergleich der Signalstärke in CIP-behandelten und nicht behandelten Zellen bestimmt. Die erfolgreiche CIP-Behandlung der Protein-Extrakte konnte anhand des veränderten Laufverhaltens von Ebf1 gezeigt werden. Eine Phosphatase-Behandlung führte hierbei zu einer geringeren molekularen Masse des Ebf1.

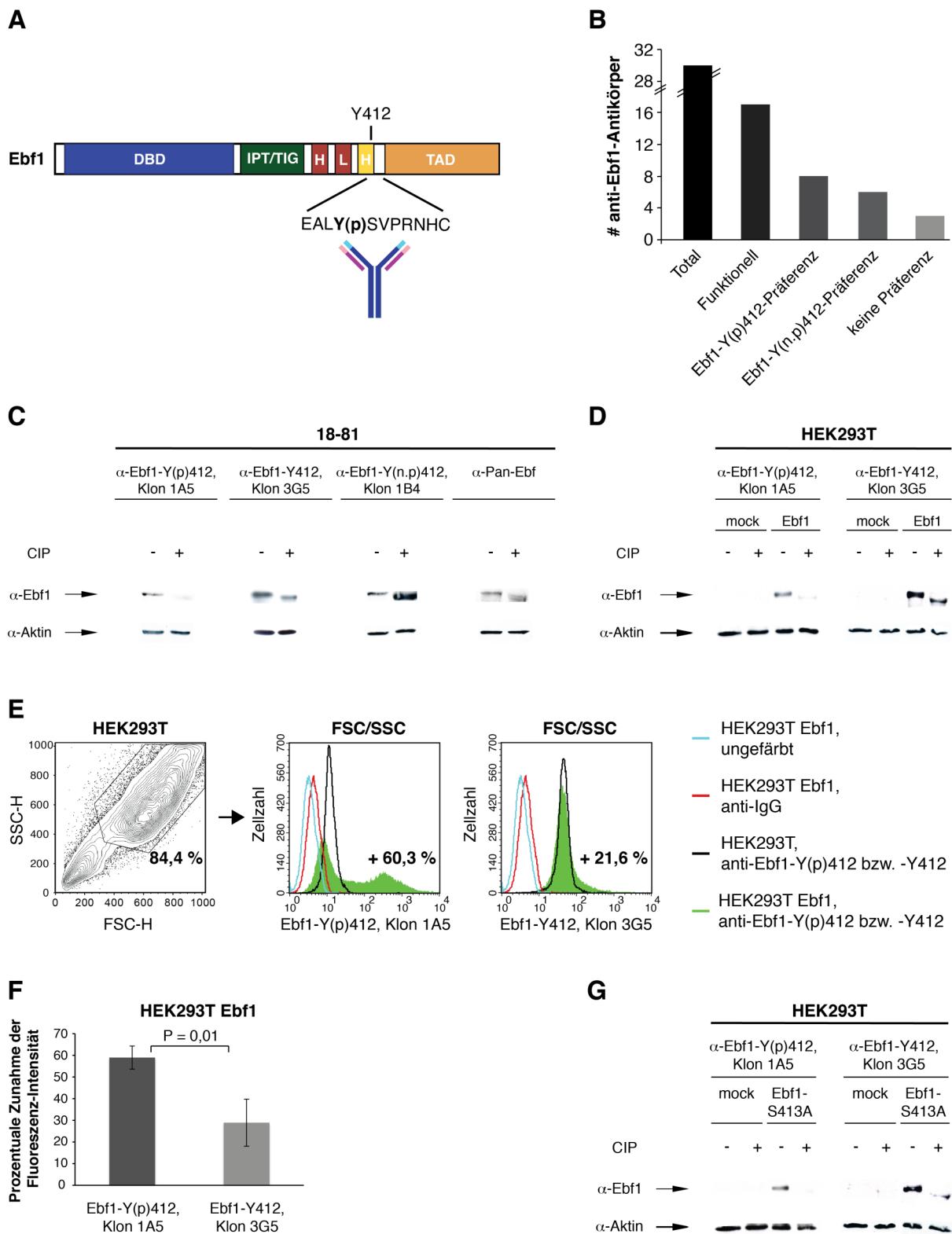


Abbildung 3.1: Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung mittels eines neu generierten Ebf1-Y(p)412-spezifischen Antikörpers

A: Schematische Darstellung der Position der Peptidsequenz, die zur Generierung von Ebf1-Y(p)412-spezifischen Antikörpern mittels des synthetischen Peptids EALY(p)SVPRNHC (Ebf1: Aminosäuren 409 - 418) verwendet wurde. **B:** Übersicht über die Funktionalität und Phosphospezifität generierter $\alpha\text{-Ebf1}$ -Antikörper. Hierzu wurden Protein-Extrakte aus 18-81-Zellen einer Phosphatase-Behandlung

(CIP) unterzogen und anschließend mittels Western Blot analysiert (s. C). (p) = phosphoryliertes Ebf1-Y412. (n.p) = nicht phosphoryliertes Ebf1-Y412. **C:** Repräsentative Western Blot-Analysen CIP-behandelter Protein-Extrakte aus 18-81-Zellen unter Verwendung generierter α -Ebf1-Antikörper mit unterschiedlicher Phosphospezifität. Als Vergleich dienten nicht CIP-behandelte Protein-Extrakte. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. **D:** Repräsentative Western-Blot-Analysen CIP-behandelter Protein-Extrakte aus transient mit pCMV-*mock* oder -*Ebf1* transfizierten HEK293T-Zellen unter Verwendung der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5. Als Vergleich dienten nicht CIP-behandelte Protein-Extrakte. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. **E:** Intrazellulärer Nachweis von Ebf1-Y(p)412 und Ebf1-Y412 in transient mit pCMV-*Ebf1* transfizierten HEK293T-Zellen mittels der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5. Als Vergleich dienten nicht transfizierte HEK293T-Zellen. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte bzw. mit dem Zweitantikörper gefärbte Zellen verwendet. **F:** Prozentuale Zunahme der Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y(p)412- bzw. Ebf1-Y412 in mit pCMV-*Ebf1* transfizierten HEK293T-Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen (s. E). n = 3. **G:** Western-Blot-Analyse CIP-behandelter Protein-Extrakte aus transient mit pCMV-*mock* oder -*Ebf1-S413A* transfizierten HEK293T-Zellen unter Verwendung der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5. Als Vergleich dienten nicht CIP-behandelte Protein-Extrakte. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, zeigte in diesem experimentellen System eine deutliche Präferenz für Ebf1-Y(p)412, während der Antikörper α -Ebf1-Y(n.p)412, Klon 1B4, präferenziell nicht phosphoryliertes Ebf1-Y412 erkannte. Der Antikörper α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, erkannte sowohl phosphoryliertes als auch nicht phosphoryliertes Ebf1-Y412. Als Kontrolle wurde der α -Pan-Ebf-Antikörper verwendet (Kieslinger *et al.*, 2010), der im N-Terminus von Ebf1 bindet und somit sowohl phosphoryliertes als auch nicht phosphoryliertes Ebf1-Y412 erkannte.

Um die Spezifität der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, weitergehend zu bestätigen, wurden diese unter Verwendung von HEK293T-Zellextrakten mittels Western Blot (Abbildung 3.1D) und intrazellulärer Durchflusszytometrie (Abbildung 3.1E + F) analysiert. Laut Ergebnissen der Massenspektrometrie (s. S. 27) scheint ektopisch in HEK293T-Zellen exprimierte Ebf1 konstitutiv phosphoryliert zu sein. Zur Analyse der Bindung der Antikörper an phosphoryliertes Ebf1-Y412 wurden daher zunächst HEK293T-Zellen transient mit pCMV-*Ebf1* transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Protein-Extrakte der transfizierten HEK293T-Zellen einer CIP-Behandlung unterzogen und anschließend unter Verwendung der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, im Western Blot analysiert (Abbildung 3.1D). Die Phosphospezifität wurde wie oben beschrieben durch den Vergleich der Signalstärke in CIP-behandelten und nicht behandelten Zellen bestimmt. Erneut zeigte der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, eine stark ausgeprägte Präferenz für phosphoryliertes Ebf1-Y412, während der Antikörper α -Ebf1-

Y412, Klon 3G5, sowohl phosphoryliertes als auch nicht phosphoryliertes Ebf1-Y412 erkannte.

Mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie transfizierter HEK293T-Zellen konnte gegenüber nicht transfizierten Zellen unter Verwendung des Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, eine durchschnittlich etwa um 59 % gesteigerte Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y(p)412 beobachtet werden (Abbildung 3.1E + F). Unter Verwendung des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, hingegen konnte nur eine um durchschnittlich etwa 29 % erhöhte Fluoreszenz-Intensität detektiert werden, wodurch die höhere Phosphospezifität des Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, weiter bestätigt wurde. Eine Veränderung in der Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y(p)412 bzw. Ebf1-Y412 wurde in dieser sowie in nachfolgenden intrazellulären Durchflusszytometrie-Analysen mithilfe der „CELL Quest Becton Dickinson“-Software bestimmt. Diese kalkuliert prozentuale Unterschiede in der Fluoreszenz-Intensität zweier Zellpopulationen durch Subtraktion der Zellpopulation mit der geringeren Fluoreszenz-Intensität. Bedingt durch diese Kalkulation werden für die Zellpopulationen mit der geringeren Fluoreszenz-Intensität keine Standardabweichungen angegeben.

Zur weitergehenden Charakterisierung der generierten Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, wurde die Bindungsspezifität dieser Antikörper an das Tyrosin an Position 412 des Ebf1 untersucht. In der Massenspektrometrie konnte in einem Durchlauf eine Phosphorylierung des dem Ebf1-Y412 benachbarten Serins S413 in 18-81-Zellen detektiert werden. Um auszuschließen, dass die Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, an dieses Serin binden, wurde dieses mittels Punktmutagenese durch Alanin substituiert und die Bindung der Antikörper an diese Ebf1-Mutante untersucht (Ebf1-S413A). Die Aminosäure Alanin weist die größte strukturelle Ähnlichkeit zu Serin auf, kann jedoch nicht phosphoryliert werden. Zunächst wurden HEK293T-Zellen transient mit pCMV-S413A transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden Protein-Extrakte der transfizierten Zellen einer CIP-Behandlung unterzogen und anschließend unter Verwendung der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, im Western Blot analysiert (Abbildung 3.1G). Wie bei einer Spezifität der Antikörper für Ebf1-Y412 erwartet, konnte trotz der Mutation des Ebf1-S413 in nicht behandelten Zellen unter Verwendung beider Antikörper Ebf1 detektiert werden.

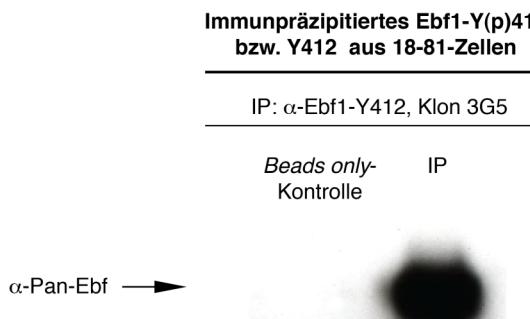
Nachdem die hohe Präferenz des Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, für Ebf1-Y(p)412 sowohl in HEK293T- als auch in 18-81-Zellen gezeigt und somit die Phosphorylierung des Ebf1-Y412 in diesen Zellen verifiziert werden konnte, wurde dieser Antikörper in nachfolgenden Experimenten vereinfacht als phosphospezifisch bezeichnet und zur Analyse

der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge verwendet, während mittels des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, die Gesamt-Ebf1-Menge der jeweiligen Zellen bestimmt wurde.

3.1.1.2 Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers

Um die Phosphorylierung des Ebf1-Y412 weitergehend zu bestätigen, wurde immunpräzipitiertes Ebf1 aus der B-Zelllinie 18-81 unter der Verwendung eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers im Western Blot analysiert. Hierzu wurde zunächst endogenes Ebf1-Y(p)412 bzw. Y412 aus 18-81-Zellen mithilfe des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, immunpräzipitiert (Abbildung 3.2A, durchgeführt von Bettina Groll, HMGU München).

A



Bettina Groll, HMGU München

B

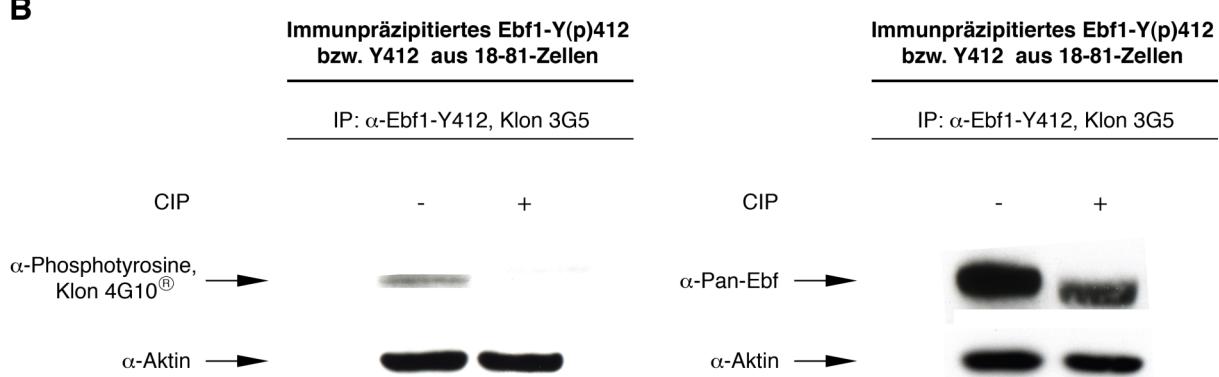


Abbildung 3.2: Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung mittels eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers

A: Western Blot-Analyse von immunpräzipitiertem Ebf1-Y(p)412 bzw. -Y412 aus 18-81-Zellen unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers. Die Immunpräzipitation (IP) erfolgte mithilfe des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5. Als Negativkontrolle (*Beads only*-Kontrolle) wurde die Immunpräzipitation mit Protein G-*Beads* ohne Verwendung des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, durchgeführt (Bettina Groll, HMGU München). **B:** Repräsentative Western Blot-Analyse der immunpräzipitierten Proteine (s. A) unter Verwendung des Antikörpers α -Phosphotyrosin, Klon 4G10® (links), und des α -Pan-Ebf-Antikörpers (rechts). Als Ladekontrolle diente β -Aktin. CIP = „Calf Intestinal Alkaline Phosphatase“

Erfolgreich immunpräzipitierte Proteine wurden anschließend unter Verwendung des Antikörpers α -Phosphotyrosin, Klon 4G10®, im Western Blot analysiert (Abbildung 3.2B, links). Hierbei konnte ein Phosphotyrosin-Protein detektiert werden, das der molekularen Masse von Ebf1 entspricht. Um die Spezifität der detektierten Bande weitergehend zu bestätigen, wurden die Extrakte CIP-behandelt. Das Vorhandensein von Gesamt-Ebf1 in den CIP-behandelten und unbehandelten Extrakten wurde mittels des α -Pan-Ebf-Antikörpers bestätigt (Abbildung 3.2B, rechts).

3.1.2 Ebf1-Y412 ist innerhalb der murinen Ebf-Proteinfamilie sowie in verschiedenen Spezies konserviert

In vielen höheren Spezies weisen Phosphorylierungsstellen generell eine höhere evolutionäre Konservierung auf als strukturell ähnliche nicht phosphorylierte Stellen desselben Proteins (Gnad *et al.*, 2010). Um die evolutionäre Konservierung des Ebf1-Y412 und umgebender Peptidsequenzen innerhalb der Ebf-Proteinfamilie aus *M. musculus* sowie verschiedener Spezies zu untersuchen, wurden deren Aminosäuresequenzen in diesem Bereich miteinander verglichen (Abbildung 3.3). Hierdurch konnte eine Konservierung der Phosphorylierungsstelle Ebf1-Y412 in allen dargestellten Spezies sowie ein hoher Homologiegrad umgebender Peptidsequenzen gezeigt werden. Eine vollkommene Übereinstimmung der umgebenden Peptidsequenzen weisen die Proteine Ebf1 und Ebf3 aus *M. musculus*, Ebf1 aus *R. norvegicus* und Ebf1 aus *H. sapiens* auf, während Ebf2 und Ebf4 aus *M. musculus* und das Ebf-Ortholog Collier aus *D. melanogaster* leichte Abweichungen in den umgebenden Peptidsequenzen zeigen. Das synthetische Peptid, welches zur Generierung Ebf1-Y(p)412-spezifischer Antikörper verwendet wurde, weist eine vollkommene Übereinstimmung zu der Peptidabfolge in den Proteinen Ebf1-3 aus *M. musculus*, Ebf1 aus *R. norvegicus* und Ebf1 aus *H. sapiens* auf (Abbildung 3.3, fett gedruckt).

| | Y412 | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------|---|---|---|----------|---|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ebf1, <i>M. musculus</i> | A | D | I | A | E | A | L | Y | S | V | P | R | N | H | N |
| Ebf2, <i>M. musculus</i> | A | D | I | A | E | A | L | Y | S | V | P | R | N | P | S |
| Ebf3, <i>M. musculus</i> | A | D | I | A | E | A | L | Y | S | V | P | R | N | H | N |
| Ebf4, <i>M. musculus</i> | A | D | V | A | E | A | L | Y | S | A | P | R | A | P | A |
| Ebf1, <i>R. norvegicus</i> | A | D | I | A | E | A | L | Y | S | V | P | R | N | H | N |
| Ebf1, <i>H. sapiens</i> | A | D | I | A | E | A | L | Y | S | V | P | R | N | H | N |
| Collier, <i>D. melanogaster</i> | A | D | L | V | E | A | L | Y | S | M | P | R | S | P | G |
| | ★ | ★ | | | ★ | ★ | ★ | ★ | ★ | | | ★ | ★ | | |

Abbildung 3.3: Ebf1-Y412 ist innerhalb der murinen Ebf-Proteinfamilie sowie in verschiedenen Spezies konserviert

Gezeigt ist eine vergleichende Darstellung von Ebf1-Y412 und umgebender Peptidsequenzen mit Ebf2-4 aus *M. musculus* sowie Ebf-Proteinen verschiedener Verte- und Invertebraten. Eine 100 %ige Übereinstimmung einer jeweiligen Aminosäure innerhalb der verglichenen Sequenzen ist mithilfe eines Sternes gekennzeichnet. Fett gedruckte Aminosäuresequenzen entsprechen der Peptidsequenz, die zur Generierung von Ebf1-Y(p)412-spezifischen Antikörpern mittels des synthetischen Peptids EALY(p)SVPRNHC (Ebf1: Aminosäuren 409 - 418) verwendet wurde.

3.1.3 Analyse des Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstatus während der murinen B-Zell-Differenzierung

3.1.3.1 Die Ebf1-Y412-Phosphorylierung konnte in Gesamt-Knochenmarkszellen, jedoch kaum in Gesamt-Milzzellen detektiert werden

Nachdem die mittels Massenspektrometrie identifizierte Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstelle (s. S. 27) erfolgreich sowohl in HEK293T- als auch in 18-81-Zellen bestätigt werden konnte (s. Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2), sollte die Ebf1-Y412-Phosphorylierung in weiterführenden Versuchen ebenfalls in primären murinen Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wurden zunächst Gesamt-Knochenmarkszellen und Gesamt-Milzzellen aus wt-Mäusen isoliert und mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 3.4).

Gegenüber Zweitantikörper-gefärbten Zellen konnte im Gesamt-Knochenmark (Abbildung 3.4A + C) unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, eine durchschnittlich um etwa 18 % gesteigerte Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y(p)412 detektiert werden. Die Gesamt-Ebf1-Menge mit einer durchschnittlich um etwa 52 % gesteigerten Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y412 wurde mithilfe des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, ermittelt.

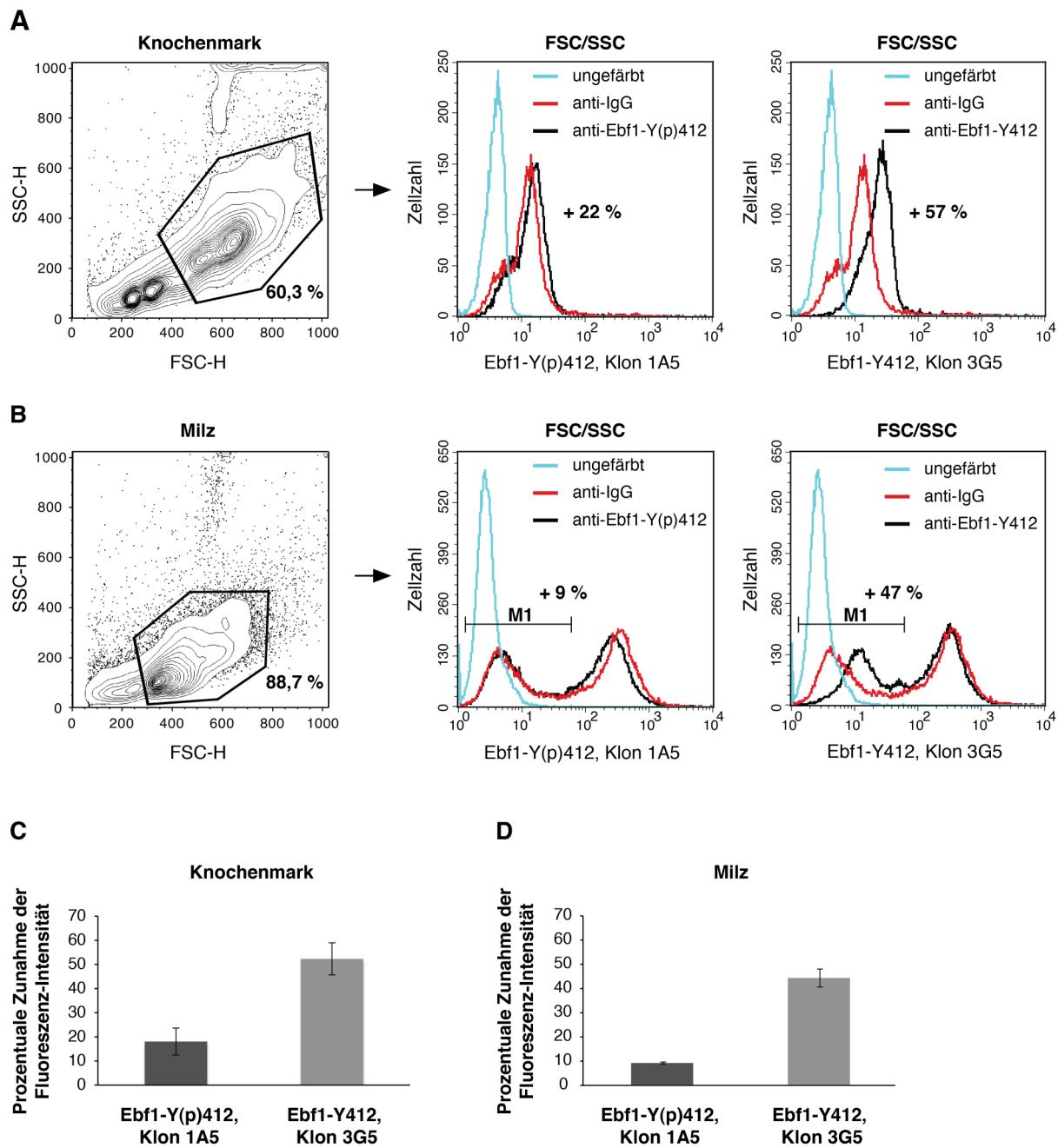


Abbildung 3.4: Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in murinen Gesamt-Knochenmarkszellen und Gesamt-Milzzellen

A + B: Intrazellulärer Nachweis von Ebf1-Y(p)412 und Ebf1-Y412 in primären Gesamt-Knochenmarkszellen (A) und Gesamt-Milzzellen (B) mittels der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5 (Mitte), und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5 (rechts). Als Negativkontrolle wurden ungefärbte bzw. mit dem Zweitantikörper gefärbte Zellen verwendet. **C + D:** Prozentuale Zunahme der Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y(p)412 und Ebf1-Y412 in Gesamt-Knochenmarkszellen (C) und Gesamt-Milzzellen (D) in M1 gegenüber Zweitantikörper-gefärbten Zellen (s. A + B). n = 2

In Gesamt-Milzzellen (Abbildung 3.4B + D) hingegen konnte mithilfe des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, zwar Gesamt-Ebf1 detektiert werden (eine durchschnittlich um etwa 44 % gesteigerte Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y412 gegenüber Zweitantikörper-gefärbten Zellen), die Zunahme der Fluoreszenz-Intensität unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, betrug jedoch durchschnittlich nur etwa 9 %.

In Milzzellen wurde zusätzlich eine zweite fluoreszierende Zellpopulation beobachtet, die jedoch auch in Zweitantikörper-gefärbten Zellen detektiert werden konnte und somit unspezifischer Natur zu sein scheint. Die Zunahme der Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y412 sowie Ebf1-Y(p)412 wurde lediglich anhand der Zellpopulation in M1 kalkuliert (Abbildung 3.4B).

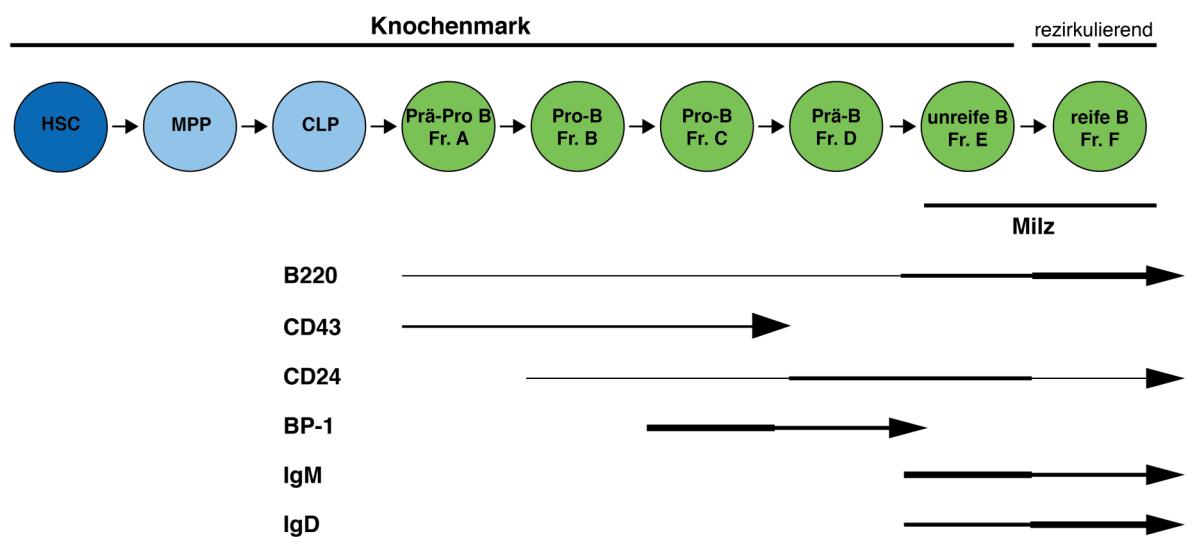
Bisherige Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass die Phosphorylierung des Ebf1-Y412 hauptsächlich im Knochenmark, jedoch kaum in den späten B-Zell-Stadien in der Milz erfolgt, was auf eine differentielle Regulierung dieser Phosphorylierung während der B-Zell-Differenzierung hinweisen könnte.

3.1.3.2 Die Ebf1-Y412-Phosphorylierung konnte in den Hardy-B-Zell-Fraktionen A-E aus dem Knochenmark und der Milz detektiert werden

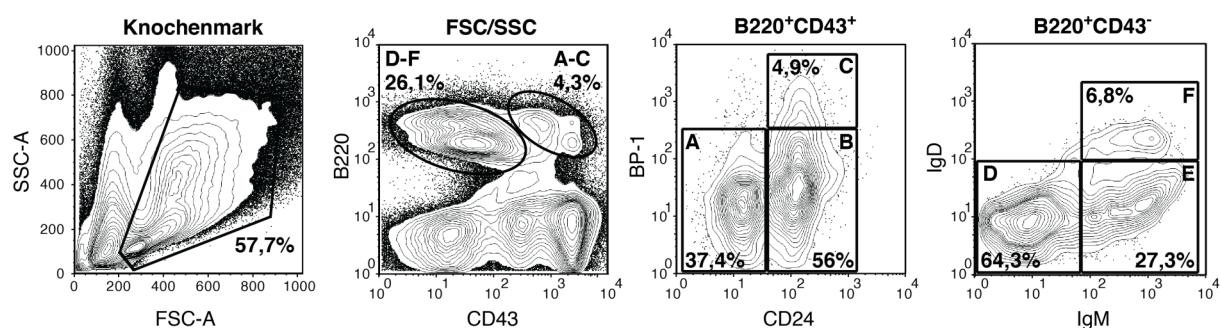
Nachdem eine Phosphorylierung von Ebf1-Y412 in Gesamt-Knochenmarkszellen und schwach in Gesamt-Milzzellen detektiert werden konnte, sollte die Ebf1-Y412-Phosphorylierung in weiterführenden Versuchen ebenfalls in den verschiedenen B-Zell-Fraktionen nachgewiesen werden.

Nach Li, Hayakawa & Hardy (1993) können B-Zellen anhand der differentiellen Expression der Oberflächenantigene *B220*, *CD43*, *CD24*, *BP-1*, *IgM* und *IgD* aus dem Knochenmark und der Milz fraktioniert werden (schematisch dargestellt in Abbildung 3.5A). Die Isolierung der Hardy-B-Zell-Fraktionen erfolgte mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellsortierung. Die Fraktionen A ($B220^+CD43^+CD24^-BP-1^-$), B ($B220^+CD43^+CD24^+BP-1^-$), C ($B220^+CD43^+CD24^+BP-1^+$) und D ($B220^+CD43^-IgM^+IgD^-$) wurden hierbei aus dem Knochenmark (Abbildung 3.5B), die Fraktionen E ($B220^+CD43^+IgM^+IgD^{niedrig}$) und F ($B220^+CD43^-IgM^+IgD^+$) aus der Milz isoliert (Abbildung 3.5C). Gezeigt sind repräsentative FACS-Auswertungen.

A



B



C

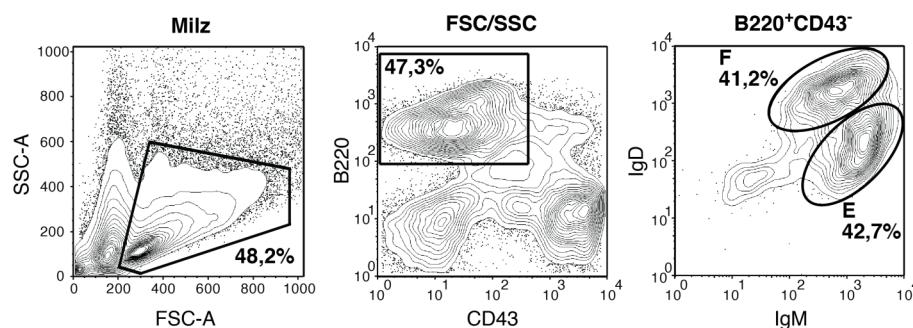
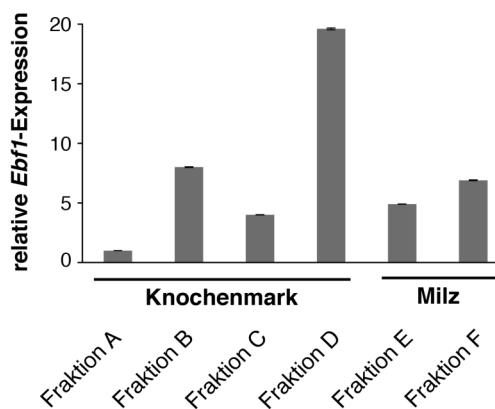


Abbildung 3.5: Hardy-B-Zell-Fraktionierung aus murinen Knochenmarks- und Milzzellsuspensionen

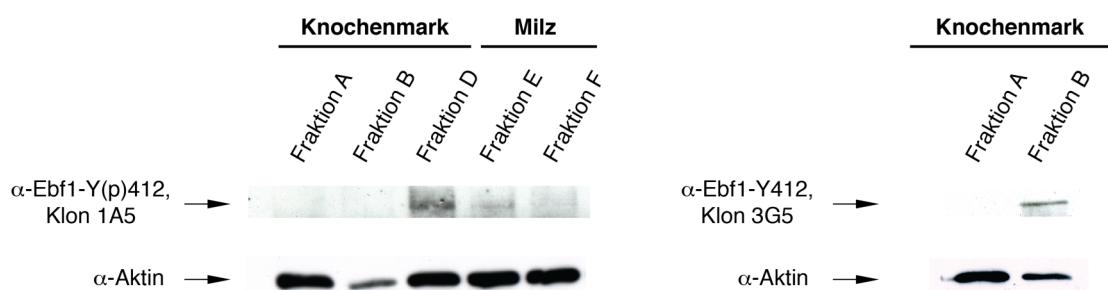
A: Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklungsstadien, klassifiziert in Hardy-B-Zell-Fraktionen (Fr. A - F), im Knochenmark und der Milz. Die Fraktionierung der Zellen erfolgte basierend auf der differentiellen Expression der Oberflächen-Antigene *B220*, *CD43*, *CD24*, *BP-1*, *IgM* und *IgD* (nach Hardy *et al.*, 1991; Li, Hayakawa & Hardy, 1993; Cancro *et al.*, 2001). HSC = hämatopoietische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*); MPP = multipotenter Vorläufer (*multipotent progenitor*); CLP = gemeinsamer lymphoider Vorläufer (*common lymphoid progenitor*). **B + C:** Isolierung von Hardy-B-Zell-Fraktionen aus Knochenmarks- (B) oder Milzzellsuspensionen (C) mittels Durchflusszytometrie-basierter Zellsortierung.

Zur Überprüfung der Reinheit sortierter Hardy-B-Zell-Faktionen sowie zur Bestimmung der Ebf1-Transkriptmenge wurden die in Abbildung 3.6B im Western Blot analysierten Fraktionen zunächst mittels quantitativer Realtime-PCR analysiert (Abbildung 3.6A).

A



B



C

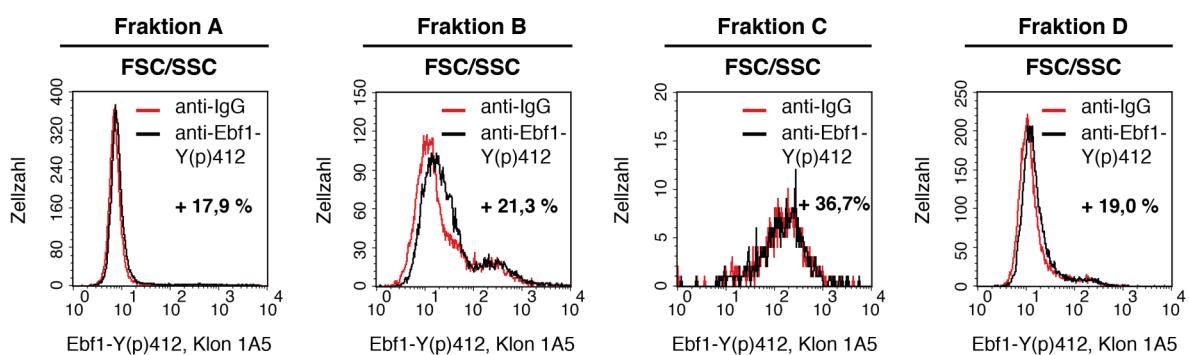


Abbildung 3.6: Die Ebf1-Y412-Phosphorylierung konnte in den Hardy-B-Zell-Faktionen A-E detektiert werden

A: Analyse der *Ebf1*-Expression der in (B) analysierten Hardy-B-Zell-Faktionen mittels quantitativer Realtime-PCR. Als Referenzgen zum Zweck der Normalisierung diente *β-Aktin*. Der Wert der Hardy-

B-Zell-Fraktion A wurde gleich 1 gesetzt. **B:** Western Blot-Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in sortierten Hardy-B-Zell-Fraktionen unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5 (links). Gesamt-Ebf1 in den Fraktionen A + B wurde mittels des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5 (rechts), nachgewiesen. Fraktionen A, B + D wurden aus murinem wt-Knochenmark, Fraktionen E + F aus der Milz isoliert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. **C:** Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in den sortierten Hardy-B-Zell-Fraktionen A-D mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie unter Verwendung des Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5. Als Negativkontrolle wurden mit dem Zweitantikörper gefärbte Zellen verwendet. n = 2 (Fraktion B), n = 1 (Fraktion A, C + D)

Wie bereits beschrieben (Roessler *et al.*, 2007), wies die Hardy-B-Zell-Fraktion A die geringste *Ebf1*-Expression auf. Zellen der Fraktion B und C zeigten demgegenüber eine durchschnittlich etwa 8-fach bzw. 4-fach erhöhte *Ebf1*-Expression. Zellen der Fraktion D wiesen mit einer etwa 19-fachen Erhöhung die höchste *Ebf1*-Expression aller Fraktionen auf. Während der fortschreitenden B-Zell-Differenzierung in die Fraktionen E und F konnte hingegen wiederum eine Abnahme der *Ebf1*-Expression beobachtet werden.

Zur Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in den Hardy-B-Zell-Fraktionen wurden diese unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, mittels Western Blot (Abbildung 3.6B) oder intrazellulärer Durchflusszytometrie (Abbildung 3.6C) untersucht. In den frühen B-Zell-Fraktionen A und B wurde zudem die Gesamt-Ebf1-Menge unter Verwendung des Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 3G5, im Western Blot analysiert (Abbildung 3.6B, rechts).

In Fraktion A konnte, entsprechend der geringen Ebf1-Transkriptmenge, im Western Blot weder Gesamt-Ebf1 (Abbildung 3.6B, rechts) noch phosphoryliertes Ebf1-Y412 (Abbildung 3.6B, links) nachgewiesen werden. Eine erste durchflusszytometrische Analyse zeigte jedoch gegenüber mit dem Zweitantikörper gefärbten Zellen eine Zunahme der Fluoreszenz-Intensität um 17,9 % (Abbildung 3.6C).

Über eine Phosphorylierung in den Zellen der Fraktion B, die im Vergleich zu Fraktion A eine erhöhte *Ebf1*-Expression aufweisen (Abbildung 3.6A + B, rechts; Roessler *et al.*, 2007), konnte im Western Blot aufgrund der geringeren Lademenge, beurteilt anhand der β -Aktin-Menge, keine Aussage getroffen werden. In zwei unabhängigen durchflusszytometrischen Analysen hingegen konnte in Zellen der Fraktion B eine Zunahme der Ebf1-Y(p)412-Fluoreszenz-Intensität um durchschnittlich etwa 19 % ($\pm 2,7\%$) beobachtet werden (Abbildung 3.6C).

Fraktion C konnte aufgrund der geringen Frequenz dieser Population im murinen Knochenmark nicht im Western Blot analysiert werden (s. Abbildung 3.5). Eine erste durchflusszytometrische Analyse zeigte jedoch eine Zunahme der Ebf1-Y(p)412-Fluoreszenz-

Intensität um 36,7 % (Abbildung 3.6C). Allerdings war auch hier die Zellzahl für eine aussagekräftige Analyse zu gering und muss in zukünftigen Versuchen wiederholt werden. Die erste Analyse der Fraktion D mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie zeigte eine Zunahme der Ebf1-Y(p)412-Fluoreszenz-Intensität um 19 % (Abbildung 3.6C). Im Western Blot konnte ebenfalls eine Ebf1-Y12-Phosphorylierung in Fraktion D sowie in geringerem Maß in Fraktion E detektiert werden (Abbildung 3.6B, links). In Fraktion F hingegen konnte, obwohl in diesen Zellen im Vergleich zu Fraktion E eine höhere Ebf1-Transkriptmenge nachgewiesen wurde (Abbildung 3.6A), keine Ebf1-Y412-Phosphorylierung detektiert werden (Abbildung 3.6B, links).

Diese Ergebnisse müssen zukünftig nochmals bestätigt werden, deuten jedoch auf eine Phosphorylierung des Ebf1-Y412 in den B-Zell-Fraktionen A - D des Knochenmarks sowie in der Fraktion E der Milz hin, während in Fraktion F der Milz kein phosphoryliertes Ebf1-Y412 detektiert werden konnte.

3.1.4 Analysen zur biologischen Funktion der Ebf1-Y412-Phosphorylierung in der B-Zell-Differenzierung

3.1.4.1 Generierung der nicht phosphorylierbaren Mutante Ebf1-Y412F und Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen

Zur Untersuchung der biologischen und biochemischen Funktion der Ebf1-Y412-Phosphorylierung wurde mittels Punktmutagenese das Tyrosin an Position 412 des Ebf1 durch Phenylalanin substituiert (Ebf1-Y412F; Abbildung 3.7A). Die Aminosäure Phenylalanin weist die größte strukturelle Ähnlichkeit zu Tyrosin auf, sodass die native Struktur des Ebf1 möglichst nicht beeinflusst werden sollte, kann jedoch im Gegensatz zu Tyrosin nicht phosphoryliert werden.

Als Ausgangsplasmid für die Punktmutagenese diente das auf dem *Murine stem cell virus* (MSCV) basierende MSCV-*Ebf1*-IRES-*Gfp*, welches zusätzlich zu Ebf1 über eine nachgeschaltete IRES-Kassette *Gfp* koexprimiert. Verwendet wurden mutierte Oligonukleotide, in denen das für Tyrosin kodierende Kodon (TAC) durch das Kodon für Phenylalanin (TTC) substituiert wurde. Das auf diese Weise hergestellte Plasmid MSCV-*Ebf1*-Y412F-IRES-*Gfp* diente anschließend der Generierung der Retrovirus-verpackenden Zelllinie GP+E86 (Abbildung 3.7B).

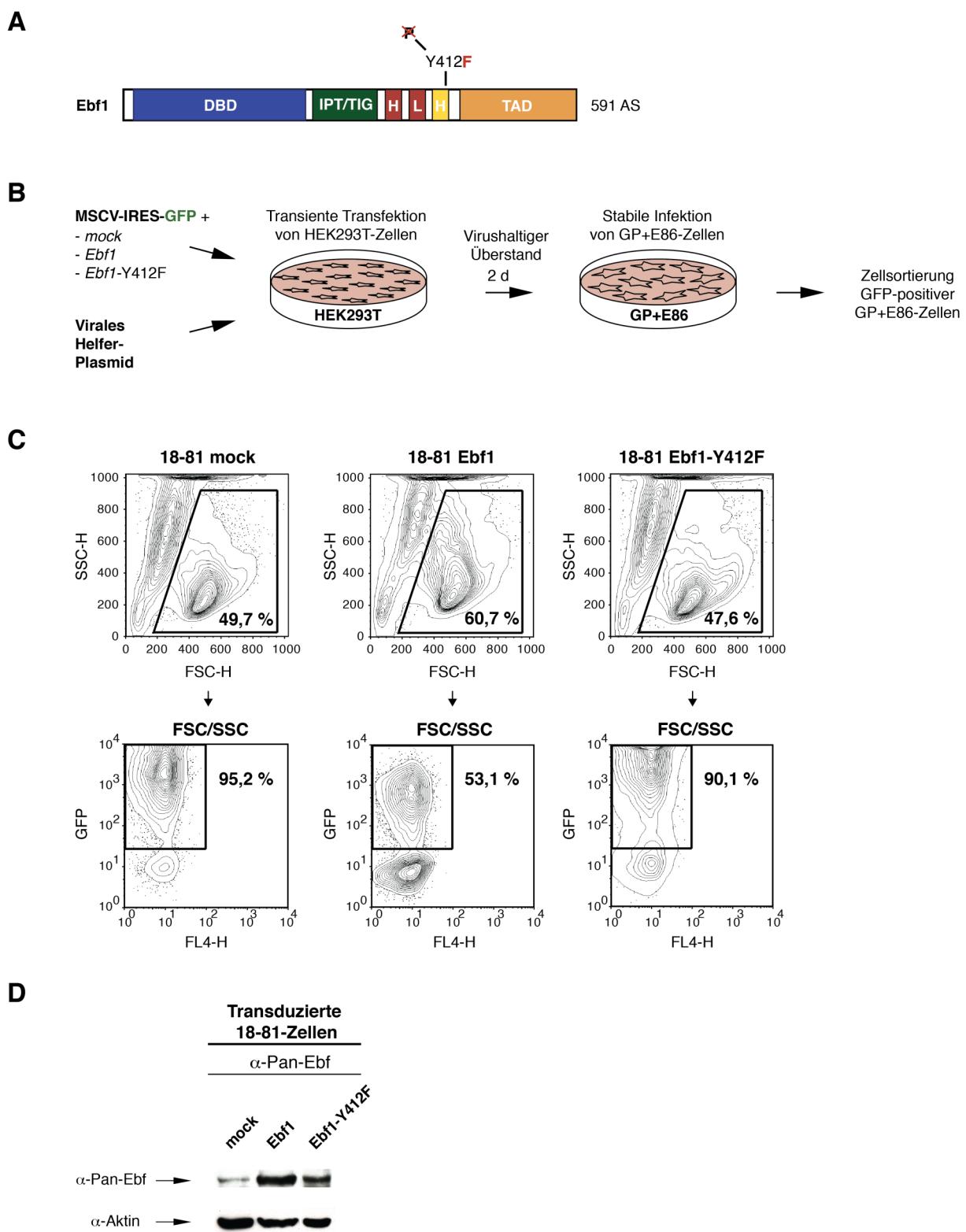


Abbildung 3.7: Generierung der Ebf1-Mutante Ebf1-Y412F und Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen

A: Schematische Darstellung der nicht phosphorylierbaren Mutante Ebf1-Y412. Mittels Punktmutagenese wurde das Tyrosin an Position 412 des Ebf1 durch Phenylalanin substituiert, welches nicht phosphoryliert (P) werden kann. **B:** Schematische Darstellung der Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen. Zunächst wurden HEK293T-Zellen mit MCV-mock-,

-*Ebf1*- oder -*Ebf1-Y412F-IRES-Gfp* sowie einem viralen Helper-Plasmid transient transfiziert. Der Viruspartikel-haltige Zellkulturüberstand der HEK293T-Zellen wurde anschließend zur Infektion von GP+E86-Zellen verwendet. Infizierte GP+E86-Zellen wurden, basierend auf der Expression von *Gfp*, 2-3 x mittels Durchflusszytometrie sortiert. **C:** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Transduktionsraten, gemessen anhand der *Gfp*-Expression, von 18-81-Zellen nach 48-stündiger Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen. **D:** Repräsentative Western Blot-Analyse der Ebf-Proteinmenge in transduzierten 18-81-Zellen (s. C) unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers. Als Vergleich dienten *mock*-transduzierte Zellen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

Zur Herstellung von Retroviren wurden zunächst HEK293T-Zellen transient mit MSCV-*Ebf1-Y412F-IRES-Gfp* sowie einem viralen Helper-Plasmid transfiziert, welches die für die Replikation und Viruspartikelbildung erforderlichen *gag*-, *pol*- und *env*-Gene trägt. Dieser Schritt dient der Erzeugung eines hohen Virustiters der Retroviren im Überstand der amphotropen HEK293T-Zellen (Persons *et al.*, 1998). Zur Herstellung einer Negativ- bzw. Positivkontrolle für nachfolgende Versuche wurden HEK293T-Zellen mit MSCV-*mock*-IRES-*Gfp* bzw. MSCV-*Ebf1*-IRES-*Gfp* transfiziert.

Der Viruspartikel-haltige Überstand der transfizierten HEK293T-Zellen wurde anschließend zur Infektion der ekotropen Zelllinie GP+E86 (Markowitz *et al.*, 1988) verwendet. Um einen möglichst hohen Virustiter zu erzielen, wurden infizierte GP+E86-Zellen, basierend auf der *Gfp*-Expression, 2-3 x mittels Durchflusszytometrie sortiert. Sortierte Zellen weisen nun eine genetische Integration des Gens von Interesse auf. Durch das Vorhandensein der *gag*-, *pol*- und *env*-Gene des *Moloney murine leukemia virus* im Genom der GP+E86-Zellen (Markowitz *et al.*, 1988) werden Helfer-freie rekombinante Retroviren permanent in den Zellkulturüberstand abgegeben, der in nachfolgenden Versuchen zur Transduktion muriner Zellen diente.

Die Funktionalität generierter Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen wurde anschließend mittels einer Transduktion der Prä-B-Zelllinie 18-81 überprüft. Hierzu wurden 18-81-Zellen für 48 h mit den GP+E86-Zellen kokultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Transduktionsraten mittels durchflusszytometrischer Analyse der *Gfp*-Expression in den 18-81-Zellen (Abbildung 3.7C). Durch die Kokultivierung mit den verschiedenen GP+E86-Zellen konnten Transduktionsraten der 18-81-Zellen zwischen etwa 53 - 95 % beobachtet werden. Zur Bestimmung der *Ebf*-Überexpression wurden Protein-Extrakte transduzierter Zellen unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers im Western Blot analysiert (Abbildung 3.7D). Während in Protein-Extrakten aus mit MSCV-*mock*-IRES-*Gfp* transduzierten Zellen wie erwartet lediglich eine schwache Bande detektiert werden konnte,

die vermutlich endogenem Ebf1 entspricht, zeigten mit MSCV-*Ebf1*-IRES-*Gfp* und MSCV-*Ebf1*-Y412F-IRES-*Gfp* transduzierte Zellen eine deutliche Ebf1-Überexpression.

Die erfolgreich generierten Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen wurden nachfolgend für Versuche zur *in vitro*- und *in vivo*-B-Zell-Differenzierung verwendet.

3.1.4.2 *Ebf1*-Y412F-transduzierte fötale Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung

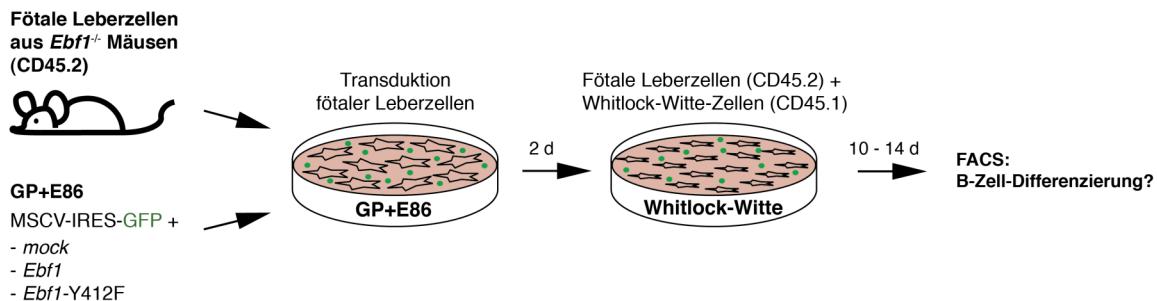
In *Ebf1*-defizienten Mäusen ist die B-Zell-Differenzierung im Prä-Pro-B-Zell-Stadium arretiert (Lin & Grosschedl, 1995). Pongubala *et al.* (2008) konnten zeigen, dass eine ektopische *Ebf1*-Expression in hämatopoietischen Vorläuferzellen aus der fötalen Leber *Ebf1*-defizienter Mäuse die B-Zell-Differenzierung wiederherstellt. Dieses System ist daher gut geeignet, um für die B-Zell-Differenzierung essentielle Bereiche des Ebf1-Proteins zu identifizieren.

Um die Relevanz der Ebf1-Y412-Phosphorylierung für die biologische Funktion des Ebf1 in der B-Zell-Differenzierung zu untersuchen, wurde im Folgenden das *in vitro*-B-Zell-Differenzierungs-Potential *Ebf1*-Y412F-transduzierter fötaler Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen analysiert (s. Abbildung 3.9). Hierzu wurden fötale Leberzellen (CD45.2) aus *Ebf1*-defizienten Mausbryonen (E16,5 - E17,5) isoliert und durch 48-stündige Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen für MSCV-*mock*-, -*Ebf1*- und -*Ebf1*-Y412F-IRES-*Gfp* (s. Abbildung 3.7) unter Zugabe von IL-3, IL-6 und SCF transduziert (Abbildung 3.8A). Im Anschluss an die retrovirale Transduktion wurden die Transduktionsraten fötaler Leberzellen anhand der *Gfp*-Expression bestimmt. Durch die Kokultivierung der Zellen mit den verschiedenen GP+E86-Zellen konnten vergleichbare Transduktionsraten von durchschnittlich etwa 18 - 23 % beobachtet werden (Abbildung 3.8C + D).

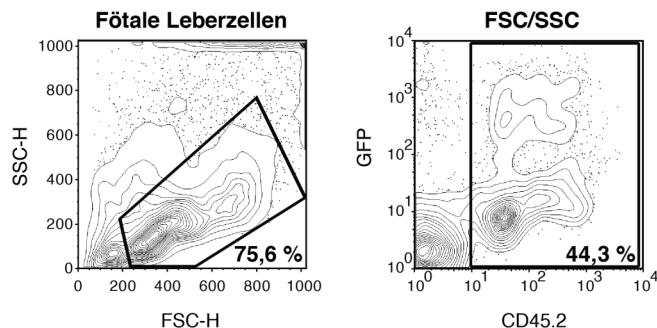
Im Anschluss an die zweitägige retrovirale Transduktion der fötalen Leberzellen wurden diese mit Whitlock-Witte-Zellen (CD45.1) kokultiviert (Abbildung 3.8A). Bei diesem von Whitlock & Witte (1982) etablierten System handelt es sich um ein Langzeit-Zellkultur-System, welches die B-Zell-Differenzierung unterstützt. Hierzu wurden zunächst zur Generierung eines stromalen *Feeder-Layers* Knochenmarkszellen aus CD45.1-Mäusen isoliert. Durch eine Kokultivierung transduzierter fötaler Leberzellen mit dem stromalen

Feeder-Layer sowie den isolierten primären Zellen des Knochenmarks wird die *in vitro*-B-Zell-Differenzierung der hämatopoietischen Zellen der fötalen Leber ermöglicht.

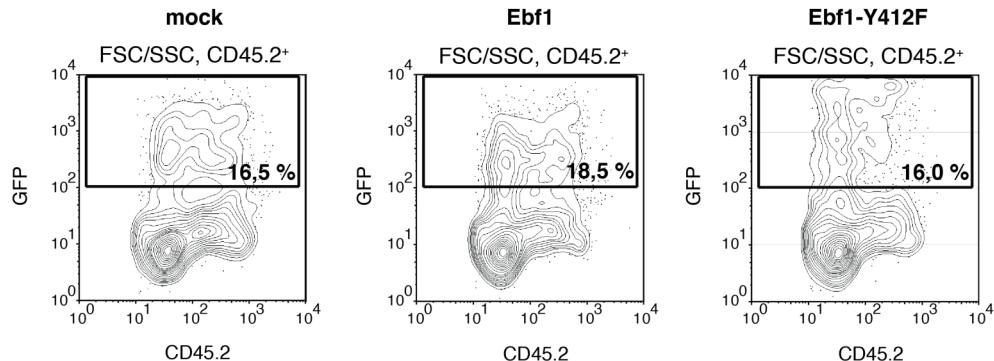
A



B



C



D

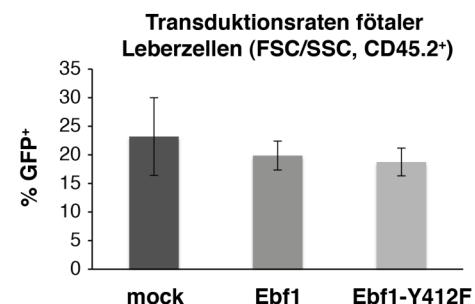


Abbildung 3.8: Retrovirale Transduktion *Ebf1*-defizienter fötaler Leberzellen und Kokultivierung mit Whitlock-Witte-Zellen

A: Schematische Darstellung des experimentellen Systems zur Untersuchung der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung. Fötale Leberzellen (CD45.2) aus *Ebf1*-defizienten Mausembryonen (E16,5 - E17,5) wurden durch eine zweitägige Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen transduziert. Nach der Bestimmung der Transduktionsraten (s. B + C) wurden die fötalen Leberzellen für 10-14 d mit Whitlock-Witte-Zellen (CD45.1) kokultiviert. Anschließend erfolgte die Analyse der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung mittels Durchflusszytometrie. **B:** Exemplarische Darstellung des Gating-Schemas zur durchflusszytometrischen Analyse der Transduktionsraten fötaler Leberzellen (FSC/SSC, CD45.2⁺; s. C + D). **C:** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Transduktionsraten, gemessen anhand der *Gfp*-Expression, fötaler Leberzellen nach 48-stündiger Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen. **D:** Transduktionsraten fötaler Leberzellen (s. C). n = 3.

Die *in vitro*-B-Zell-Differenzierung wurde nach 10-14 d anhand der *CD19*-Expression der transduzierten fötalen Leberzellen am Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.9). Bei *CD19* handelt es sich um ein Oberflächenantigen, das vom Pro-B-Zellstadium (Fraktion B) an während der gesamten B-Zell-Differenzierung exprimiert wird (Rolink *et al.*, 1993a, 1994a, 1994b & 1996; Chen *et al.*, 1994). Die Verwendung des CD45.1/CD45.2-Systems ermöglichte hierbei die Unterscheidung CD19-positiver Zellen, die durch Differenzierung fötaler Leberzellen entstanden sind, von solchen, die sich aus den Knochenmarkszellen der CD45.1-Mäuse entwickelt haben.

Wie von Pongubala *et al.* (2008) bereits beschrieben, konnte durch eine ektopische *Ebf1*-Expression in *Ebf1*-defizienten fötalen Leberzellen die B-Zell-Differenzierung dieser Zellen wiederhergestellt werden (durchschnittlich etwa 63 % CD19-positive transduzierte fötale Leberzellen). Hingegen führte eine ektopische Expression von *Ebf1*-Y412F nicht zu einem signifikant erhöhten Anteil CD19-positiver Zellen (durchschnittlich etwa 10 % CD19-positive Zellen) gegenüber *mock*-transduzierten Zellen, die wie erwartet einen Arrest in der B-Zell-Differenzierung zeigten (durchschnittlich etwa 8 % CD19-positive Zellen).

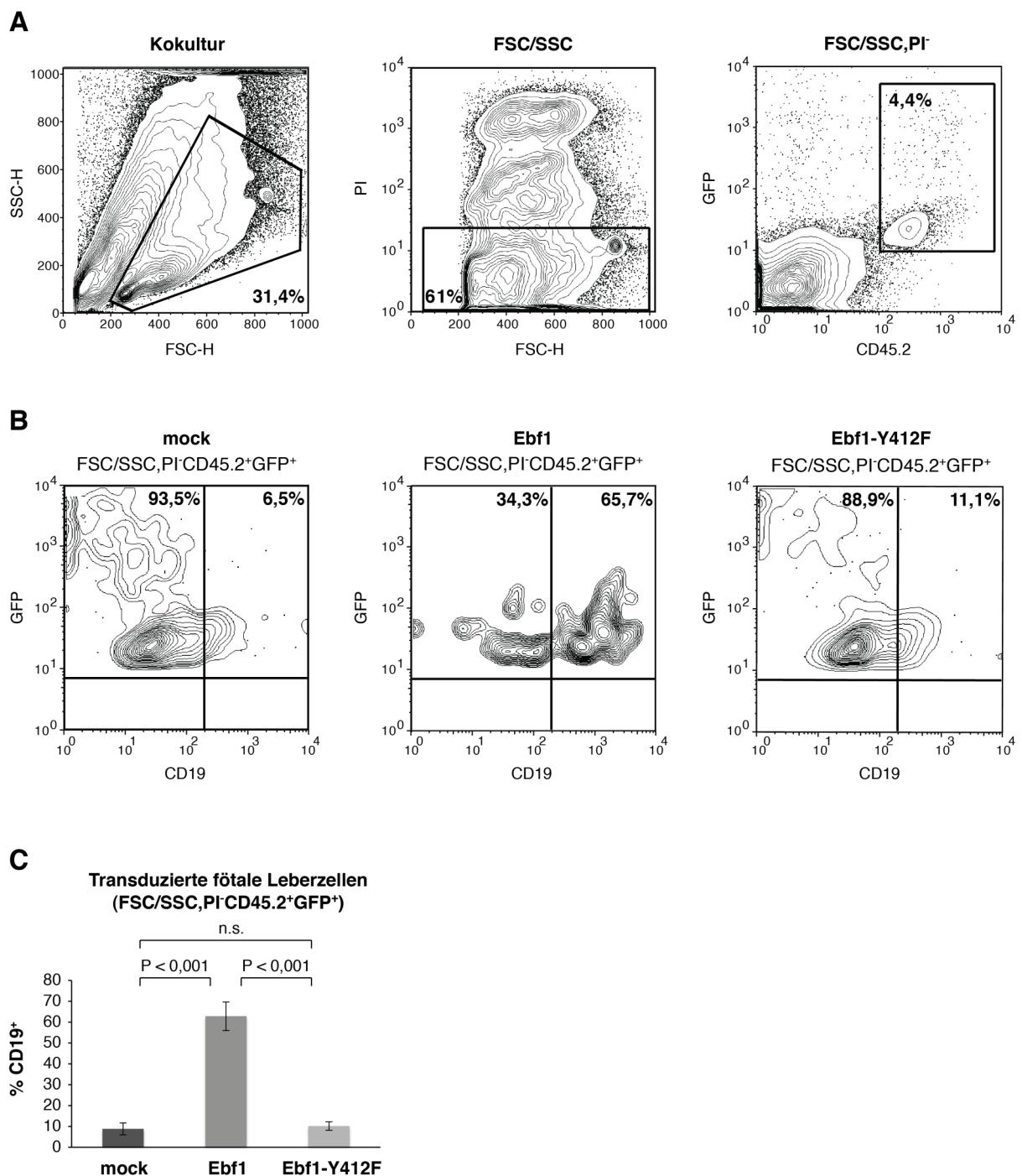


Abbildung 3.9: *Ebf1*-Y412-transduzierte fötale Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung

A: Exemplarische Darstellung des Gating-Schemas zur durchflusszytometrischen Analyse transduzierter fötaler Leberzellen ($\text{FSC/SSC,PI}^{\text{-}}\text{CD45.2}^{\text{+}}\text{GFP}^{\text{+}}$; s. B + C). **B:** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung, gemessen anhand der CD19-Expression, transduzierter fötaler Leberzellen ($\text{FSC/SSC,PI}^{\text{-}}\text{CD45.2}^{\text{+}}\text{GFP}^{\text{+}}$) nach der Kokultivierung mit Whitlock-Witte-Zellen (13 d). **C:** Prozentualer Anteil CD19-positiver Zellen an transduzierten fötalen Leberzellen (s. B). n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$). $n = 3$

3.1.4.3 *Ebf1*-Y412F-transduzierte fötale Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der *in vivo*-B-Zell-Differenzierung

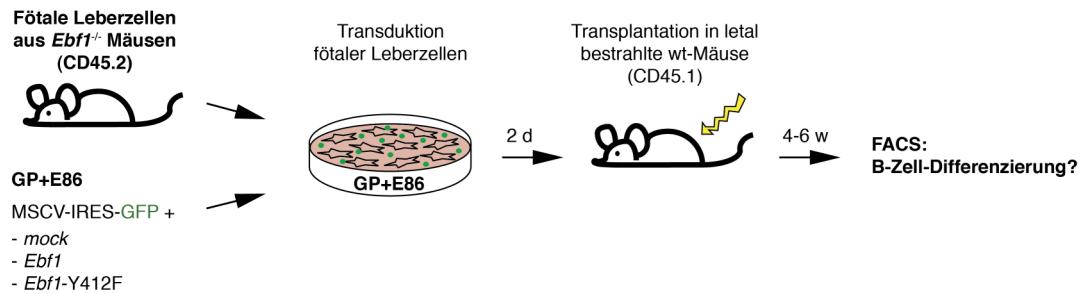
Nachdem *Ebf1*-Y412F-transduzierte fötale Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen einen Defekt in der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung zeigten, wurde im Folgenden das Potential dieser Zellen zur *in vivo*-B-Zell-Differenzierung analysiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Ebf1*-defizierte fötale Leberzellen das hämatopoietische System, mit Ausnahme von B-Zellen, letal bestrahlter Mäuse rekonstituieren können, wenn sie zusammen mit wt-Knochenmarkszellen transplantiert werden (Pongubala *et al.*, 2008).

Zur Analyse des *in vivo*-B-Zell-Differenzierungs-Potentials wurden fötale Leberzellen (CD45.2) aus *Ebf1*-defizienten Mausembryonen (E16,5 - E17,5) mittels 48-stündiger Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen für MSCV-*mock*-, -*Ebf1*- und *Ebf1*-Y412F-IRES-*Gfp* unter Zugabe von IL-3, IL-6 und SCF transduziert (Abbildung 3.10A). Im Anschluss an die retrovirale Transduktion wurden zunächst, wie in Abbildung 3.8 gezeigt, die Transduktionsraten fötaler Leberzellen anhand der *Gfp*-Expression bestimmt, diese dann im Verhältnis 3:1 mit Knochenmarkszellen 8-12 Wochen alter CD45.1-Mäuse vermischt und in die Schwanzvene letal bestrahlter (820 rad) CD45.1-Mäuse injiziert (Abbildung 3.10A). 4-6 Wochen nach der Rekonstitution der Mäuse wurde die *in vivo*-B-Zell-Differenzierung transduzierter fötaler Leberzellen durch Analyse des Knochenmarks rekonstituierter Tiere bestimmt. Hierzu wurde der Anteil B220- bzw. CD19-positiver transduzierter fötaler Leberzellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt (Abbildung 3.10C + D). Das Oberflächenantigen B220 wird im Gegensatz zu CD19 bereits ab dem Prä-Pro-B-Zellstadium (Fraktion A) an während der gesamten B-Zell-Differenzierung exprimiert (Coffman, 1982; Hardy *et al.*, 1991). Die Verwendung des CD45.1/CD45.2-Systems ermöglicht hierbei die Unterscheidung B220- bzw. CD19-positiver Zellen, die durch Differenzierung fötaler Leberzellen entstanden sind, von solchen, die sich aus nach der Bestrahlung residualen Knochenmarkszellen der CD45.1-Mäuse oder kotransplantierten Knochenmarkszellen entwickelt haben.

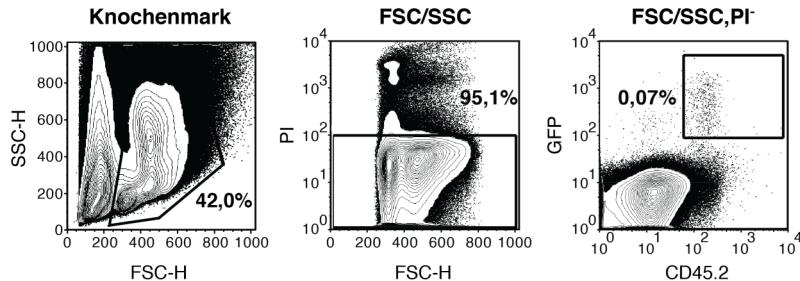
Durch eine ektopische *Ebf1*-Expression in *Ebf1*-defizienten fötalen Leberzellen konnte die B-Zell-Differenzierung *in vivo* wiederhergestellt werden (durchschnittlich etwa 87 % B220-positive Zellen und 93 % CD19-positive Zellen), während *mock*-transduzierte Zellen wie erwartet nicht in die Hardy-B-Zell-Fraktion B differenzierten (durchschnittlich etwa 8 % B220-positive Zellen und 3 % CD19-positive Zellen). Eine ektopische Expression von *Ebf1*-Y412F hingegen führte zwar zu einem signifikant erhöhten Anteil B220-positiver (durchschnittlich etwa 25 %) und CD19-positiver Zellen (durchschnittlich etwa 19 %)

gegenüber *mock*-transduzierten Zellen, die B-Zell-Differenzierung gegenüber *Ebf1*-transduzierten Zellen war jedoch durchschnittlich um etwa 75 % reduziert.

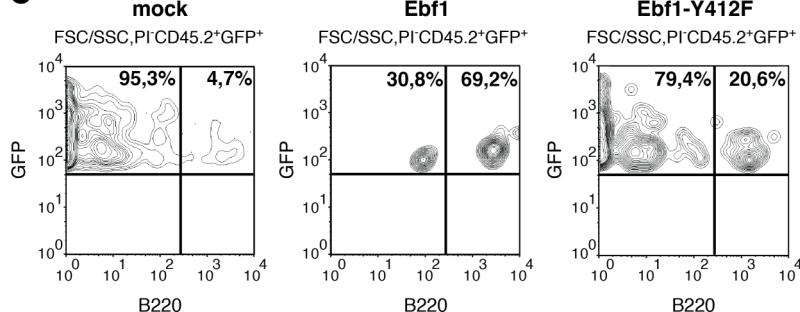
A



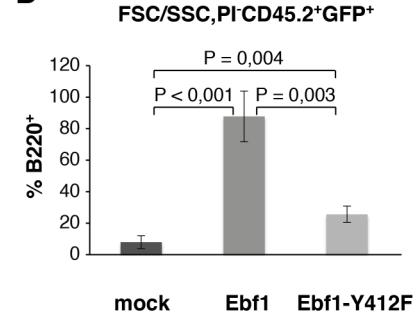
B



C



D



C

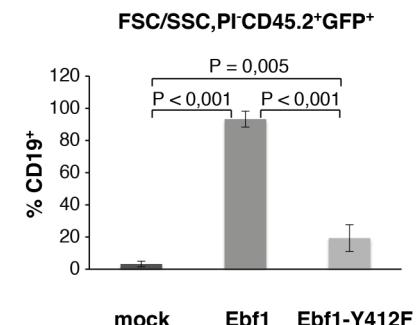
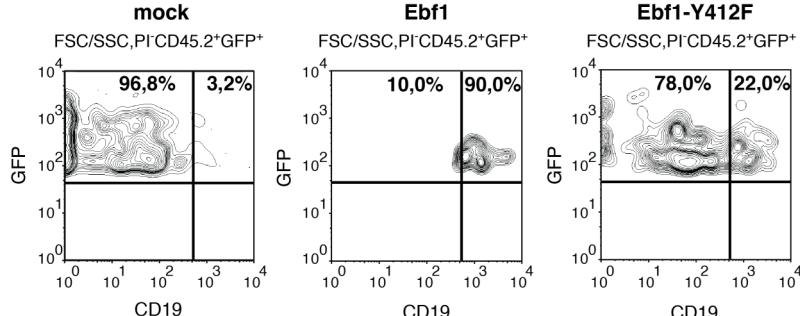


Abbildung 3.10: *Ebf1*-Y412-transduzierte fötale Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der *in vivo*-B-Zell-Differenzierung

A: Schematische Darstellung des experimentellen Systems zur Untersuchung der *in vivo*-B-Zell-Differenzierung. Fötale Leberzellen (CD45.2) aus *Ebf1*-defizienten Mausembryonen (E16,5 - E17,5) wurden mittels einer zweitägigen Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen

transduziert. Nach der Bestimmung der Transduktionsraten (s. Abbildung 3.8) wurden die fötalen Leberzellen in letal bestrahlte wt-Mäuse (CD45.1) transplantiert. Zur Bestimmung des *in vivo*-B-Zell-Differenzierungs-Potentials der transplantierten Zellen wurde 4 - 6 w nach der Transplantation das Knochenmark der Empfängertiere mittels Durchflusszytometrie analysiert. **B:** Exemplarische Darstellung des *Gating*-Schemas zur durchflusszytometrischen Analyse transduzierter fötaler Leberzellen (FSC/SSC,PI⁻CD45.2⁺GFP⁺; s. C+D) aus dem Knochenmark rekonstituierter Mäuse. **C:** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der *in vivo*-B-Zell-Differenzierung, gemessen anhand der *B220*- und *CD19*-Expression, transduzierter fötaler Leberzellen (FSC/SSC,PI⁻CD45.2⁺GFP⁺) 6 w nach der Transplantation. **D:** Prozentualer Anteil B220-positiver (oben) und CD19-positiver (unten) Zellen an transduzierten fötalen Leberzellen (s. C). n = 3

3.1.5 Analysen zur biochemischen Funktion der Ebf1-Y412-Phosphorylierung

3.1.5.1 Ebf1-Y412F ist im Nukleus von HEK293T-Zellen lokalisiert

Um auszuschließen, dass die Substitution des Ebf1-Y412 durch Phenylalanin zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des nukleären Transkriptionsfaktors durch beispielsweise Konformationsänderung oder Zerstörung eines nukleären Lokalisationssignals führt, wurden HEK293T-Zellen transient mit pcDNA3.1-Flag-*Ebf1*-Y412F transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden aus diesen Zellen die zytoplasmatische sowie die nukleäre Fraktion extrahiert und mittels des α -Pan-Ebf-Antikörpers im Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (mock), als Positivkontrolle mit wt-*Ebf1* transfiziert. Abbildung 3.11 zeigt, dem wt-Ebf1 entsprechend, die überwiegende Lokalisation von Ebf1-Y412F in der Kernfraktion transfizierter Zellen, womit eine veränderte subzelluläre Lokalisation des mutierten Transkriptionsfaktors ausgeschlossen werden konnte.



Abbildung 3.11: Der mutierte Transkriptionsfaktor Ebf1-Y412F ist im Nukleus von HEK293T-Zellen lokalisiert

Repräsentative Western Blot-Analyse der subzellulären Lokalisation von Ebf1-Y412F. Aus transient mit pcDNA3.1-Flag-*mock*, -*Ebf1* oder *Ebf1*-Y412F transfizierten HEK293T-Zellen wurden 48 h nach

der Transfektion zytoplasmatische (ZF) und nukleäre Fraktionen (NF) extrahiert und unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers im Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

3.1.5.2 Ebf1-Y412F bindet an die Ebf1-Bindestelle des *Mb-1*-Promoters

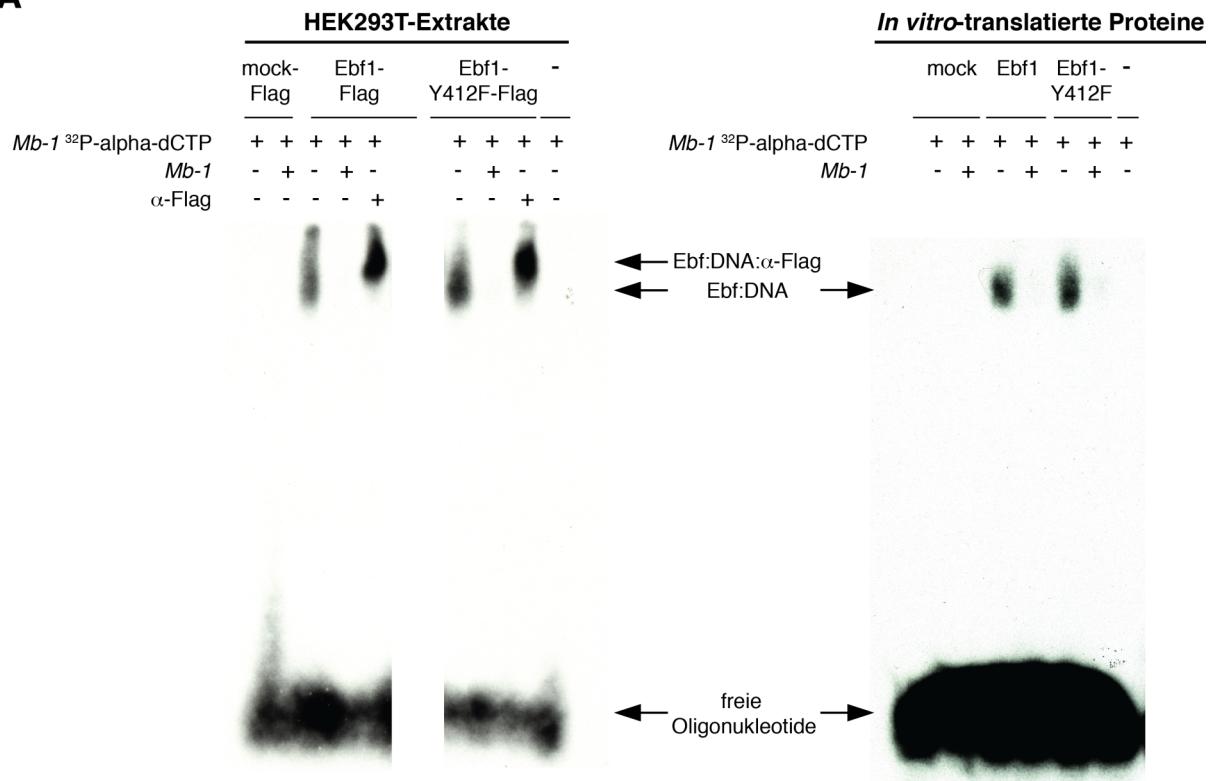
Zur Untersuchung der Bindungsaktivität der Ebf1-Mutante Ebf1-Y412F wurden Gelretardierungs-Experimente durchgeführt. Da eine Bindung von Ebf1 an die Nukleotidsequenz 5'-CAAGGGAAT-3' im *Mb-1*-Promotor bereits gezeigt werden konnte (Hagman *et al.* 1991; Feldhaus *et al.*, 1992), wurde ein durch 32 P-alpha-dCTP radioaktiv markiertes Oligonukleotid dieser Bindestelle verwendet. In die Bindereaktion wurden zunächst Zelllysate transfizierter HEK293T-Zellen eingesetzt (Abbildung 3.12A, links). HEK293T-Zellen wurden hierzu transient mit pcDNA3.1-Flag-basierten Expressionsplasmiden transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor verwendet. Eine erfolgreiche Expression der Proteine wurde mittels Western Blot-Analysen unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers bestätigt (Abbildung 3.12B, links).

Die Gelretardierung der HEK293T-Lysate zeigte eine dem wt-Ebf1 vergleichbare Bindeaktivität von Ebf1-Y412F an die Ebf1-Bindestelle des *Mb-1*-Promoters. Der Nachweis der Bindungsspezifität erfolgte mittels Kompetition durch ein nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid sowie durch Zugabe eines α -Flag-Antikörpers. Durch die spezifische Bindung dieses Antikörpers an den Ebf-Flag:DNA-Komplex konnte das Laufverhalten dieses Komplexes im nativen Gel verlangsamt werden (*Supershift*).

Zur weiteren Bestätigung der Bindung von Ebf1-Y412F an die Ebf1-Bindestelle des *Mb-1*-Promoters wurde die Gelretardierung ebenfalls mit *in vitro*-translatierten Proteinen aus Retikulozyten-Lysaten durchgeführt (Abbildung 3.12A, rechts). Die *in vitro*-Translation erfolgte mithilfe pBS-basierter Expressionsplasmide. Als Negativkontrolle wurde wiederum der Leervektor verwendet. Die erfolgreiche *in vitro*-Translation der Proteine wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers bestätigt (Abbildung 3.12B, rechts).

Die Gelretardierung der Retikulozyten-Extrakte zeigte ebenfalls eine dem wt-Ebf1 vergleichbare Bindeaktivität von Ebf1-Y412F an die Ebf1-Bindestelle des *Mb-1*-Promoters. Der Nachweis der Bindungsspezifität erfolgte mittels Kompetition durch ein nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid.

A



B

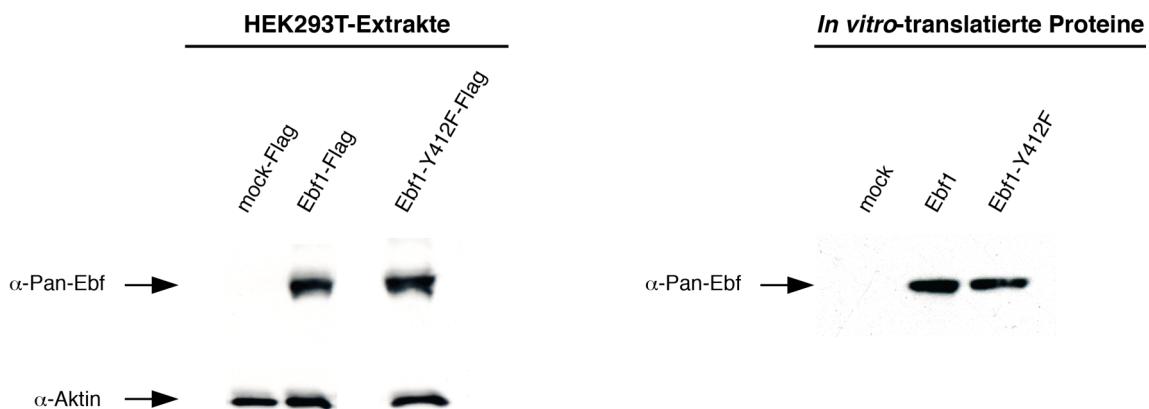


Abbildung 3.12: Ebf1-Y412F bindet an die Ebf1-Bindestelle des *Mb-1*-Promoters

A: Repräsentative Gelretardierungen von Zelllysaten aus transient mit pcDNA3.1-Flag-mock, -*Ebf1* oder *Ebf1*-Y412 transfizierten HEK293T-Zellen (links) oder mittels pBS-mock, -*Ebf1* oder *Ebf1*-Y412F *in vitro*-translatierten Proteinen aus Retikulozyten-Lysaten (rechts). *Mb-1* 32 P-alpha-dCTP: radioaktiv markiertes Oligonukleotid. *Mb-1*: nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid. Durch Zugabe eines α -Flag-Antikörpers wurde ein *Supershift* des Ebf:DNA-Komplexes erzielt (links). **B:** Western Blot-Analyse der in A verwendeten Lysate aus HEK293T-Zellen (links) und *in vitro*-translatierten Proteinen (rechts) unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers. Als Ladekontrolle für HEK293T-Lysate wurde β -Aktin verwendet.

3.1.5.3 Die Fähigkeit zur Ebf1-induzierten Transaktivierung des *Lambda5*-Promotors wird durch Modifikationen der Aminosäure Y412 beeinflusst

Um zu untersuchen, ob das Transaktivierungspotential von Ebf1 durch Modifikationen der Aminosäure Y412 beeinflusst wird, wurden Luziferase-Reporter-Assays durchgeführt.

Für den *Lambda5*-Promotor wurde bereits eine Ebf1-induzierte Aktivität in Ba/F3-Zellen beschrieben, welche durch eine Koexpression von *E2A* zusätzlich erhöht wird (Sigvardsson *et al.*, 1997). Die murine Pro-B-Zelllinie Ba/F3 ist besonders für den Luziferase-Reporter-Assay geeignet, da sie keine Expression von *E47* (Murre *et al.*, 1991; Shen & Kadesch, 1995) und nur eine geringe *Ebf1*-Expression aufweist (s. Abbildung 3.15).

Daher wurden Ba/F3-Zellen in der vorliegenden Arbeit transient mit pCMV-basierten Expressionsplasmiden für Ebf1-Proteine mit unterschiedlichen Modifikationen der Aminosäure Y412 und ggf. die *E2A*-Spleißvariante E47 sowie dem Reporter-Konstrukt pBL-*Lambda5-Luc* (Sigvardsson *et al.*, 1997) transfiziert. Dieses Reporter-Plasmid enthält sowohl Ebf- als auch E2A-Bindestellen und exprimiert Ebf- und E2A-abhängig das *Luziferase*-Reportergen unter Kontrolle des *Lambda5*-Promotors (Abbildung 3.13A). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pBL-*Luc* verwendet. Zur Normalisierung der Luziferase-Aktivität wurden die Ba/F3-Zellen zusätzlich mit dem pCMV-basierten Expressionsplasmid für *LacZ* transfiziert.

Dargestellt in Abbildung 3.13B ist die relative Induktion des *Lambda5*-Promotors durch Ebf1, Ebf1-Y412F und Ebf1-Y412D, gemessen anhand der Luziferase-Aktivität 48 h nach der Transfektion. Bei Ebf1-Y412D handelt es sich um eine aktivierende Ebf1-Mutante, bei der eine Phosphorylierung der Aminosäure Y412 durch die Substitution von Tyrosin durch Asparaginsäure imitiert wird. Durch eine Transfektion der Ba/F3-Zellen mit *Ebf1* konnte durchschnittlich eine 5,3-fache Aktivierung des *Lambda5*-Promotors beobachtet werden, während die Fähigkeit zur Transaktivierung durch die nicht phosphorylierbare Ebf1-Mutante Ebf1-Y412F gegenüber wt-Ebf1 durchschnittlich um etwa 28 % reduziert war (3,8-fache Aktivierung). Durch die Expression der aktivierenden Ebf1-Mutante Ebf1-Y412D konnte wiederum eine dem wt-Ebf1 entsprechende Transaktivierung des *Lambda5*-Promotors beobachtet werden (durchschnittlich etwa 6-fache Induktion).

Abbildung 3.13C zeigt die kombinierte Expression der Ebf-Proteine und E2A. Hierbei konnte durch eine Kotransfektion der Ba/F3-Zellen mit *Ebf1* und *E2A* durchschnittlich eine etwa 17,2-fache Induktion des *Lambda5*-Promotors beobachtet werden. Diese Induktion wurde durch Modifikationen der Aminosäure Y412 nicht signifikant beeinflusst. Wie bereits gezeigt werden konnte (Sigvardsson *et al.*, 1997), führte die Expression von *E2A* in Abwesenheit von

Ebf-Proteinen zu keiner signifikanten Induktion des *Lambda5*-Promotors (Abbildung 3.13D). Bisherige Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass Modifikationen der Aminosäure Y412 des Ebf1 nicht die synergistische Transaktivierung des *Lambda5*-Promotors durch Ebf1 und E2A beeinflussen.

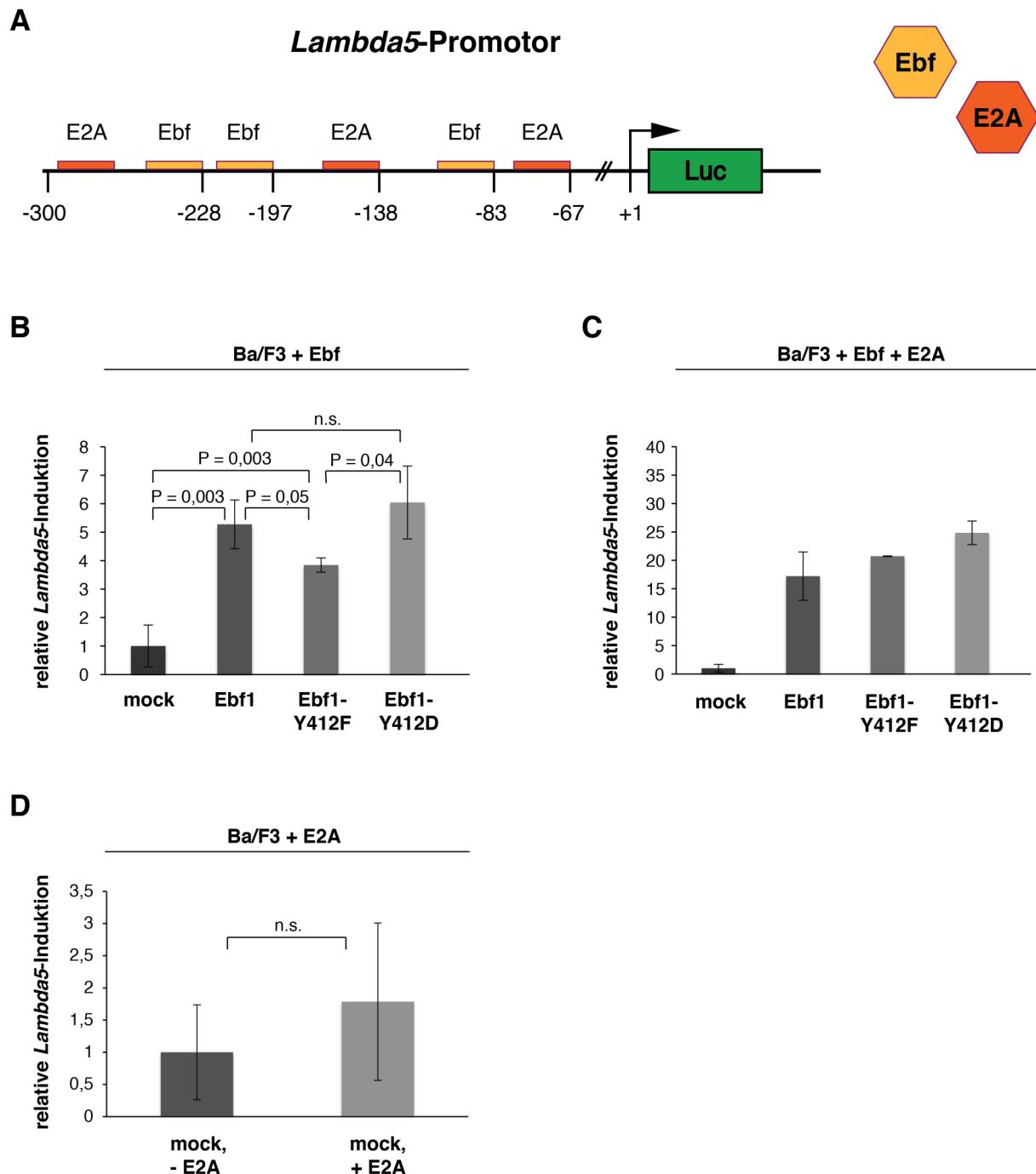


Abbildung 3.13: Modifikationen der Aminosäure Y412 beeinflussen die Ebf1-induzierte Transaktivierung des *Lambda5*-Promotors

A: Schematische Darstellung zur Durchführung des Luziferase-Reporter-Assays unter Verwendung von pCMV-basierten Expressionsplasmiden für diverse Ebf-Proteine und E2A sowie des Reporter-Plasmids pBL-*Lambda5-Luc*. Enthaltene Ebf- und E2A-Bindestellen im Reporter-Plasmid sind

schematisch dargestellt (modifiziert nach Sigvardsson *et al.*, 1997). **B:** Relative Induktion des *Lambda5*-Promotors, gemessen anhand der Luziferase-Aktivität, durch Ebf1, Ebf1-Y412F und Ebf1-Y412D in Ba/F3-Zellen 48 h nach der Transfektion. Erhaltene Luziferase-Werte wurden zunächst mittels der β -Galaktosidase-Aktivität und anschließend mittels der Luziferase-Aktivität in mit dem Leervektor pBL-Luc transfizierten Zellen normalisiert. Zur Analyse der relativen Induktion des *Lambda5*-Promotors wurde die Induktion in pCMV-mock-transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$). n = 3. **C:** Relative Induktion des *Lambda5*-Promotors, gemessen anhand der Luziferase-Aktivität, durch Ebf1, Ebf1-Y412F und Ebf1-Y412D in Kombination mit E2A in Ba/F3-Zellen 48 h nach der Transfektion. Die Normalisierung erfolgte wie unter B beschrieben. n = 2. **D:** Induktion des *Lambda5*-Promotors in pCMV-mock-transfizierten Zellen in An- oder Abwesenheit von E2A. Die Normalisierung erfolgte wie unter B beschrieben. Zur Analyse der relativen Induktion des *Lambda5*-Promotors durch E2A wurde die Induktion in pCMV-mock-transfizierten Zellen in Abwesenheit von E2A gleich 1 gesetzt. n = 3

3.1.5.4 Reduzierte Transaktivierung der Ebf1-Zielgene *VpreB* und *Mb-1* durch Ebf1-Y412F in Ba/F3-Zellen

Zur weitergehenden Charakterisierung des Transaktivierungspotentials von Ebf1-Y412F wurde in Ba/F3-Zellen die Ebf1-Y412F-induzierte Expression der B-Zell-spezifischen Gene *VpreB* und *Mb-1* untersucht (Abbildung 3.14). Sowohl *VpreB* als auch *Mb-1* wurden bereits als direkte Ebf1-Zielgene identifiziert (Lin & Grosschedl, 1995; Sigvardsson *et al.*, 1997; O’Riordan & Grosschedl 1999; Sigvardsson *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte für *VpreB* eine Ebf1-induzierte Expression in Ba/F3-Zellen gezeigt werden (Sigvardsson *et al.*, 1997).

Um den Einfluss einer ektopischen *Ebf1*-Y412F-Expression auf das Expressionslevel beider Zielgene zu untersuchen, wurden Ba/F3-Zellen transient mit dem Expressionsplasmid pCMV-*Ebf1*-Y412F transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor, als Positivkontrolle mit wt-*Ebf1* transfiziert. Die Analyse der *VpreB*- und *Mb-1*-Expression erfolgte 48 h nach der Transfektion mittels quantitativer Realtime-PCR. Zum Zweck der Normalisierung wurde die *Ebf*-Expression in mit pCMV-*Ebf1* und -*Ebf1*-Y412F transfizierten Zellen angeglichen und jeweils gleich 1 gesetzt. Im Vergleich zu *mock*-transfizierten Zellen, die lediglich endogenes *Ebf1* exprimieren, konnte in diesen Zellen eine etwa 2000-fach erhöhte *Ebf*-Expression gemessen werden (Abbildung 3.14A).

Zur Bestimmung der relativen Zielgen-Expression wurde der Wert der mit *Ebf1* transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. Eine erste Analyse zeigte, dass in Folge der ektopischen Expression von *Ebf1*-Y412F eine gegenüber der Leervektor-Kontrolle um etwa 23-fach erhöhte *VpreB*-Expression (Abbildung 3.14B) und eine um etwa 27-fach erhöhte *Mb-1*-Expression (Abbildung 3.14C) detektiert werden konnte. Gegenüber der wt-Ebf1-Kontrolle wies die Mutante Ebf1-Y412 jedoch eine um etwa 17 % reduzierte *VpreB*- (Abbildung 3.14B) und eine um etwa 30 % reduzierte *Mb-1*-Transaktivierung auf (Abbildung 3.14C).

Dieses Ergebnis muss zwar nochmals bestätigt werden, liefert jedoch einen ersten Hinweis auf die möglicherweise reduzierte Transaktivierung der Gene *VpreB* und *Mb-1* durch Ebf1-Y412.

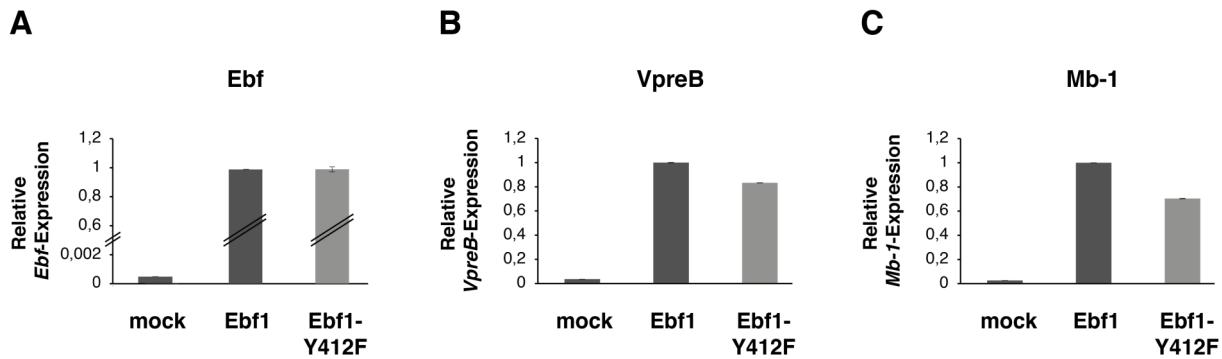


Abbildung 3.14: Reduzierte Transaktivierung der Ebf1-Zielgene *VpreB* und *Mb-1* durch Ebf1-Y412F in Ba/F3-Zellen

A: Analyse der *Ebf*-Expression in transient mit pCMV-*mock*, -*Ebf1* oder -*Ebf1*-Y412 transfizierten Ba/F3-Zellen 48 h nach der Transfektion mittels quantitativer Realtime-PCR. Als Referenzgen zum Zweck der Normalisierung diente *Hprt*. Der Wert der mit pCMV-*Ebf1* und -*Ebf1*-Y412F transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. **B + C:** Analyse der *VpreB*- (B) und *Mb-1*- (C) Expression in den unter A beschriebenen Zellen. Erhaltene Werte wurden zunächst mittels der *Hprt*- und anschließend mittels der *Ebf*-Expression normalisiert. Zur Analyse der relativen Expression wurde der Wert der mit pCMV-*Ebf1* transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. n = 1, technisches Triplikat.

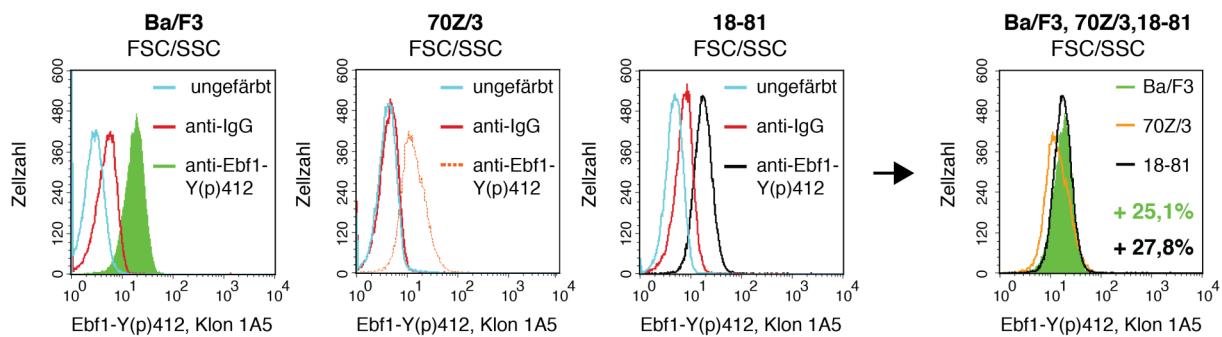
3.1.6 Analysen zur Regulierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung während der B-Zell-Differenzierung

3.1.6.1 Der Anteil von phosphoryliertem Ebf1-Y412 an der Gesamt-Ebf1-Menge variiert zwischen verschiedenen B-Zelllinien

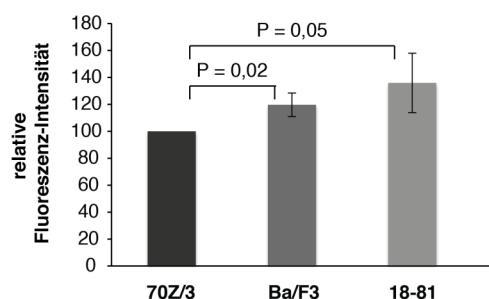
Um die Regulierung der Phosphorylierung von Ebf1-Y412 in B-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in den B-Zelllinien Ba/F3, 70Z/3 und 18-81 analysiert. Die unreifste B-Zelllinie stellt hierbei die Pro-B-Zelllinie Ba/F3 dar, während 70Z/3 und 18-81 Prä-B-Zelllinien sind (Paige *et al.*, 1978; Siden *et al.*, 1979; Palacios *et al.*, 1984 & 1985). Hierzu wurden die B-Zelllinien unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 3.15A + B). Hierbei zeigte sich, dass die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in 70Z/3-Zellen gegenüber Ba/F3-Zellen um durchschnittlich etwa 19,6 % und gegenüber 18-81 um durchschnittlich etwa 35,9 % reduziert war. Hingegen ergaben Western Blot-Analysen der Gesamt-Ebf1-Menge in den B-Zelllinien unter

Verwendung des Antikörpers α -Pan-Ebf, dass *Ebf1* in Ba/F3-Zellen am schwächsten und in 18-81-Zellen am stärksten exprimiert wird (Abbildung 3.15C). Somit konnte eine Diskrepanz zwischen der Gesamt-*Ebf1*-Menge und der *Ebf1*-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3- und 70Z/3-Zellen gezeigt werden.

A



B



C

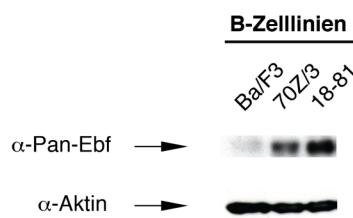


Abbildung 3.15: Der Anteil von phosphoryliertem Ebf1-Y412 an der Gesamt-Ebf1-Menge variiert zwischen Ba/F3-, 70Z/3- und 18-81-Zellen

A: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von Ebf1-Y(p)412 in Ba/F3-, 70Z/3- und 18-81-Zellen mittels des Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte bzw. mit dem Zweitantikörper gefärbte Zellen verwendet. Angegeben ist die prozentuale Zunahme der Fluoreszenz-Intensität in Ba/F3- (grün) bzw. 18-81-Zellen (schwarz) gegenüber 70Z/3-Zellen.
B: Relative Fluoreszenz-Intensität (in %) von Ebf1-Y(p)412 in Ba/F3-, 70Z/3- und 18-81-Zellen (s. A). Die Fluoreszenz-Intensität der 70Z/3-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. n = 3. **C:** Repräsentative Western Blot-Analyse der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge in Ba/F3-, 70Z/3- und 18-81-Zellen mittels des Antikörpers α -Pan-Ebf. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

3.1.6.2 Die Kinaseaktivität der Bruton-Tyrosinkinase (Btk) hat keinen Einfluss auf die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge

Laut Datenbankanalysen (nach Zhou *et al.*, 2004, und Xue *et al.*, 2005; durchgeführt von Dr. Matthias Kieslinger, HMGU München) wurde die Bruton-Tyrosinkinase (Btk) als mögliche Kinase für die Ebf1-Y412-Phosphorylierung vorhergesagt. Eine Rolle von Btk in der murinen B-Zell-Differenzierung konnte bereits gezeigt werden. Wie in Abbildung 3.16A schematisch dargestellt, wird durch eine *Btk*-Defizienz in geringerem Maß die Transition von Pro- zu Prä-B-Zellen sowie in höherem Maß die Transition von unreifen zu reifen B-Zellen negativ beeinflusst, wodurch diese Mäuse eine reduzierte Anzahl von Prä- und reifen B-Zellen zeigen (Klaus *et al.*, 1997; Loder *et al.*, 1999; Rolink *et al.*, 1999; Cancro *et al.*, 2001).

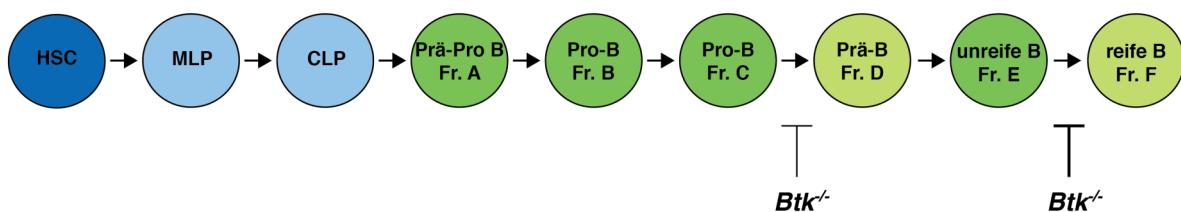
Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der Kinaseaktivität von Btk und der Phosphorylierung von Ebf1-Y412 besteht, wurde die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge nach der Inhibition bzw. Deletion von *Btk* *in vitro* bzw. *in vivo* untersucht.

Zunächst wurden hierzu 18-81-Zellen für 4 h mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors LFM-A13 behandelt. Dieser inhibiert bis zu einer Konzentration von 300 µM spezifisch Btk sowie die *Polo-like kinase* (Mahajan *et al.*, 1999; Vassilev *et al.*, 1999; Uckun *et al.*, 2007). Anschließend wurden Protein-Extrakte dieser Zellen bezüglich der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, im Western Blot untersucht (Abbildung 3.16B). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei keiner verwendeten Inhibitor-Konzentration eine veränderte Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge zu beobachten war. Um zu überprüfen, ob die Inhibitor-Zugabe die Gesamt-Ebf1-Menge in den 18-81-Zellen beeinflusst, wurden die Antikörper α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, und α -Pan-Ebf verwendet. Hierdurch konnte eine vergleichbare Gesamt-Ebf1-Menge in behandelten und unbehandelten Zellen gezeigt werden.

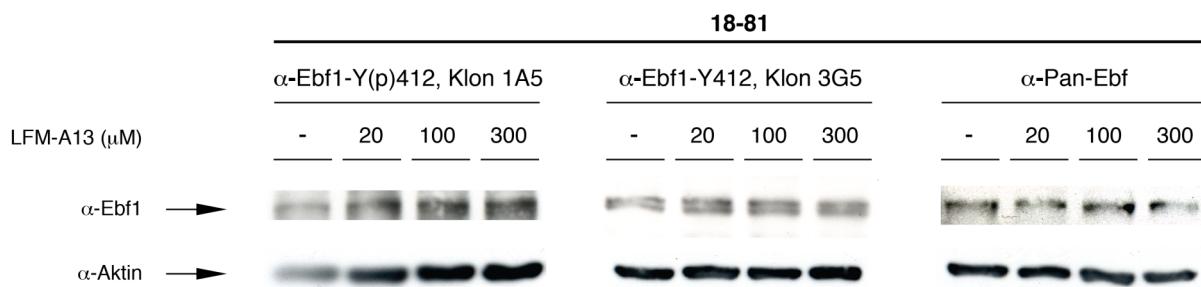
Um die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge unter *Btk*-defizienten Bedingungen *in vivo* zu untersuchen, wurden Gesamt-Knochenmarkszellen aus *Btk*-defizienten Mäusen (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wilfried Ellmeier, Medizinische Universität Wien) unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, im Western Blot untersucht (Abbildung 3.16C). Als Vergleich dienten Gesamt-Knochenmarkszellen aus wt-Mäusen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu wt-Tieren die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge im Gesamt-Knochenmark *Btk*-defizienter Mäuse nicht

beeinflusst war. Mittels der Antikörper α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, und α -Pan-Ebf konnte wiederum eine vergleichbare Gesamt-Ebf1-Menge gezeigt werden.

A



B



C

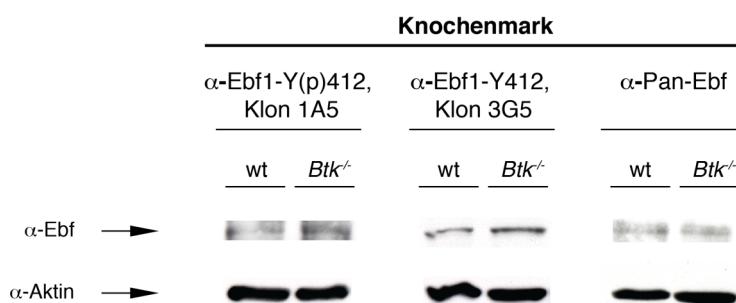


Abbildung 3.16: Die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge wird durch die Kinaseaktivität von Btk nicht beeinflusst

A: Schematische Darstellung der Rolle von Btk in der murinen B-Zell-Differenzierung. *Btk*-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Anzahl von Prä-B-Zellen (Fraktion D) und reifen B-Zellen (Fraktion F; nach Cancro *et al.*, 2001). **B:** Repräsentative Western Blot-Analysen der Ebf1-Y(p)412- und der Gesamt-Ebf1-Menge in LFM-A13-behandelten (20 μ M, 100 μ M oder 300 μ M; für 4 h) 18-81-Zellen unter Verwendung der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5 (links), α -Ebf1-Y412, Klon 3G5 (Mitte), und α -Pan-Ebf (rechts). Als Vergleich dienten unbehandelte 18-81-Zellen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. **C:** Repräsentative Western Blot-Analysen der Ebf1-Y(p)412- und der Gesamt-Ebf1-Menge in Gesamt-Knochenmarkszellen aus wt- und *Btk*-defizienten Mäusen unter Verwendung der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5 (links), α -Ebf1-Y412, Klon 3G5 (Mitte), und α -Pan-Ebf (rechts). Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

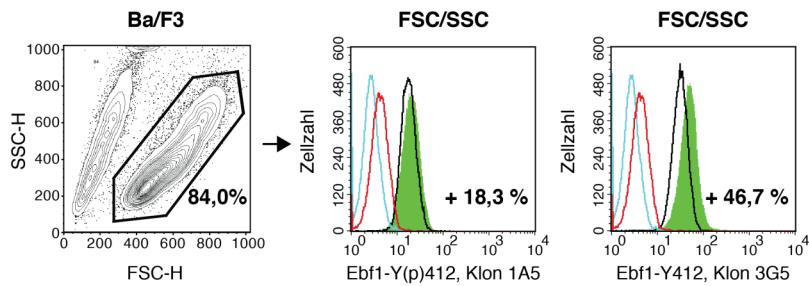
3.1.6.3 Eine exogene IL-7-Stimulation resultierte in einer erhöhten Ebf1-Y412-Phosphoryierungsmenge in Ba/F3- und 70Z/3-Zellen

Für *IL-7* oder den *IL-7R α* defiziente Mäuse weisen einen Defekt in der B-Zell-Differenzierung auf, der dem *Ebf1*-defizienter Mäuse ähnelt (Peschon *et al.*, 1994; von Freedeen-Jeffry *et al.*, 1995; Lin & Grosschedl, 1995). So ist im Knochenmark adulter Tiere die B-Zell-Differenzierung im Prä-Pro-B-Zell-Stadium arretiert (Kikuchi *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte ein Einfluss IL-7-vermittelter Signalübertragung auf die Expression von *Ebf1* in *M. musculus* gezeigt werden (Dias *et al.*, 2005; Kikuchi *et al.*, 2005 & 2008; Roessler *et al.*, 2007; Tsapogas *et al.*, 2011). Um zu untersuchen, ob die IL-7-vermittelte Signalübertragung ebenfalls die Phosphorylierung von Ebf1-Y412 beeinflusst, wurde die Ebf1-Y412-Phosphoryierungsmenge in verschiedenen B-Zelllinien nach einer exogenen IL-7-Stimulation bestimmt. Hierzu wurden Ba/F3-, 70Z/3- und 18-81-Zellen für 24 h mit IL-7 stimuliert und anschließend unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 3.17A + B). Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen.

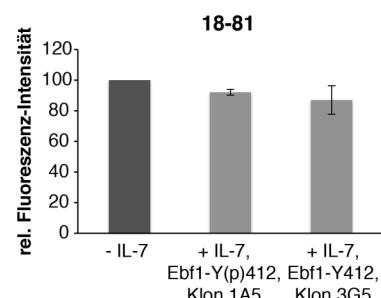
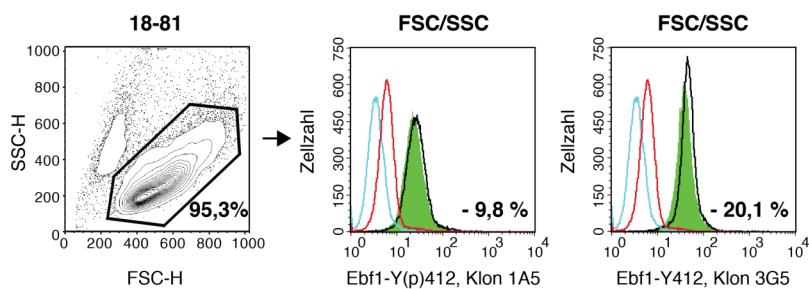
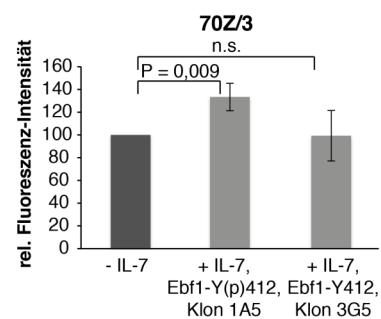
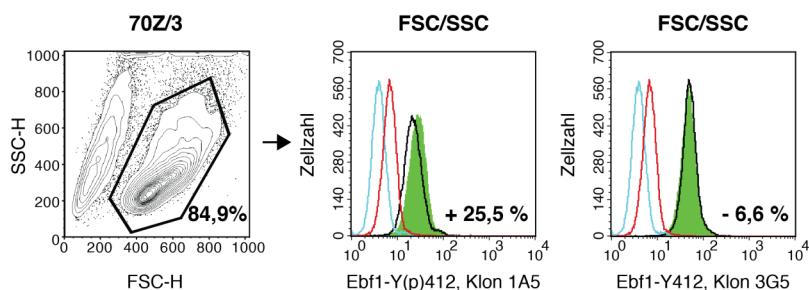
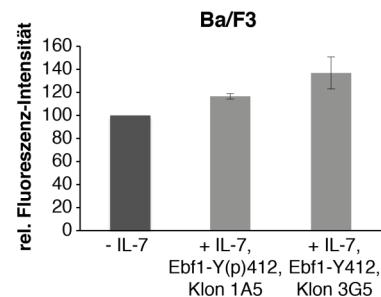
In der Zelllinie Ba/F3 konnte nach der IL-7-Stimulation unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, eine durchschnittlich um 17 % erhöhte Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y(p)412 detektiert werden (Abbildung 3.17A + B). Um zu untersuchen, ob die Zellen auf die IL-7-Stimulation zusätzlich mit einer Erhöhung der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge reagieren, wurde der Antikörper α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, verwendet. Hierbei konnte gegenüber nicht stimulierten Zellen eine Steigerung der Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y412 um durchschnittlich etwa 37 % beobachtet werden. Eine Analyse der in Abbildung 3.17A exemplarisch dargestellten Zellen mittels quantitativer Realtime-PCR zeigte eine dementsprechend erhöhte *Ebf1*-Expression auf Transkriptions-Ebene in stimulierten Zellen (etwa 4,4-fach; Abbildung 3.17C). In der Zelllinie 70Z/3 konnte nach der IL-7-Stimulation unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y(p)412 nachgewiesen werden (durchschnittlich um etwa 33 %). Im Gegensatz zu den Ba/F3-Zellen reagierten die Zellen jedoch nicht mit einer Erhöhung der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge auf die IL-7-Stimulation. Stattdessen zeigten stimulierte Zellen gegenüber unstimulierten Zellen eine unveränderte bzw. leicht reduzierte Gesamt-Ebf1-Proteinmenge. So konnte unter Verwendung des Antikörpers α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, eine durchschnittlich um etwa 1,5 % reduzierte Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y412 beobachtet werden. Dementsprechend war

ebenfalls die Ebf1-Transkriptmenge in den in Abbildung 3.17A exemplarisch dargestellten stimulierten Zellen durchschnittlich etwa 1,1-fach erniedrigt.

A



B



Legende:

- Ba/F3, 70Z/3 oder 18-81 + IL-7, ungefärbt
- Ba/F3, 70Z/3 oder 18-81 + IL-7, anti-IgG
- Ba/F3, 70Z/3 oder 18-81, - IL-7, anti-Ebf1-Y(p)412 bzw. -Y412
- Ba/F3, 70Z/3 oder 18-81 + IL-7, anti-Ebf1-Y(p)412 bzw. -Y412

C

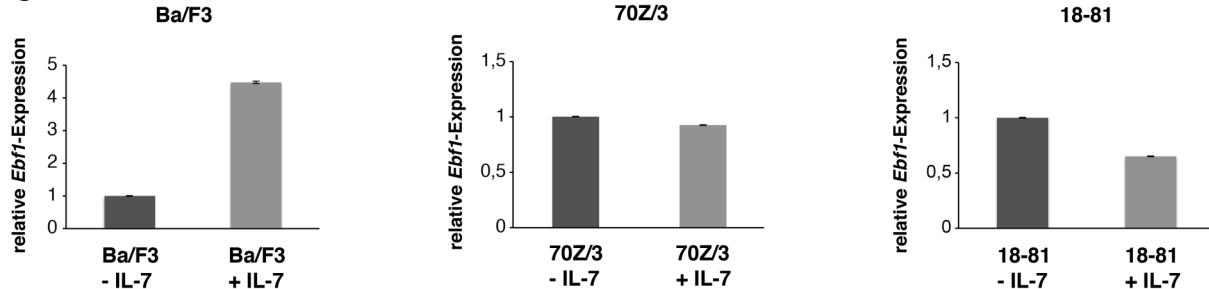


Abbildung 3.17: Eine exogene IL-7-Stimulation resultierte in einer erhöhten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3- und 70Z/3-Zellen

A: Intrazelluläre Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge und der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge in Ba/F3- (oben), 70Z/3- (Mitte) und 18-81-Zellen (unten) nach 24-stündiger IL-7-

Stimulation. Verwendet wurden die Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5. Als Vergleich dienten nicht stimuliert Zellen. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte bzw. mit dem Zweitantikörper gefärbte Zellen verwendet. **B:** Relative (rel.) Fluoreszenz-Intensität (in %) von Ebf1-Y(p)412 und Ebf1-Y412 in Ba/F3-, 70Z/3- und 18-81-Zellen nach der IL-7-Stimulation (s. A). Die Fluoreszenz-Intensität nicht stimulierter Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. n = 3 (70Z/3), n = 2 (Ba/F3 und 18-81). **C:** Analyse der *Ebf1*-Expression der in (A) exemplarisch dargestellten stimulierten und nicht stimulierten Zellen mittels quantitativer Realtime-PCR. Als Referenzgen zum Zweck der Normalisierung diente β -Aktin. Der Wert nicht stimulierter Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

Die Zelllinie 18-81 reagierte auf die IL-7-Stimulation weder mit einer Zunahme der Ebf1-Y(p)412- noch der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge. Stattdessen konnte in stimulierten Zellen unter Verwendung des phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, eine Reduktion der Ebf1-Y(p)412-Menge um durchschnittlich etwa 8 % beobachtet werden, während die Gesamt-Ebf1-Proteinmenge um durchschnittlich etwa 13 % erniedrigt war. Dementsprechend war die *Ebf1*-Expression auf Transkriptions-Ebene etwa 1,5-fach reduziert (Abbildung 3.17A - C).

In bisherigen Experimenten konnte daher eine Beeinflussung der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3- und 70Z/3-Zellen in Abhängigkeit IL-7-vermittelter Signalübertragung beobachtet werden. Während in Ba/F3-Zellen die exogene IL-7-Stimulation sowohl in einer erhöhten Gesamt-Ebf1- als auch Ebf1-Y(p)412-Menge resultierte, war in 70Z/3-Zellen lediglich die Ebf1-Y(p)412-Menge erhöht. Dies könnte darauf hindeuten, dass die für die Ebf1-Y412-Phosphorylierung verantwortliche Kinase durch die IL-7-vermittelte Signalübertragung reguliert wird.

3.1.6.4 Die Inhibition von Jak-Kinasen resultierte in einer verminderten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3-Zellen

Es ist bekannt, dass die IL-7-vermittelte Signalübertragung zu einer Aktivierung des Jak/Stat-Signalweges führt und dass die Expression von *Ebf1* in *IL7-R α* -defizienten Prä-Pro-B-Zellen durch eine ektopische Expression von Stat5 induziert wird (Lin *et al.*, 1995; Goetz *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2005; Roessler *et al.*, 2007).

Die B-Zelllinie Ba/F3 zeigte in vorherigen Versuchen eine Zunahme der Ebf1-Y412-Phosphorylierungs- sowie der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge als Reaktion auf eine IL-7-Stimulation (s. Abbildung 3.17). Um den Einfluss IL-7-vermittelter Signalübertragung auf die Phosphorylierung von Ebf1-Y412 in Ba/F3-Zellen weitergehend zu analysieren, wurden diese für 24 h mit dem Jak-Inhibitor TG101348 behandelt (Wernig *et al.*, 2008). Anschließend erfolgte die Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge unter Verwendung des

phosphospezifischen Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie (Abbildung 3.18A + B). Als Kontrolle dienten nicht behandelte Zellen. Hierbei konnte in Jak-Inhibitor-behandelten Ba/F3-Zellen eine durchschnittlich um etwa 36 % reduzierte Fluoreszenz-Intensität von Ebf1-Y(p)412 detektiert werden. Um zu untersuchen, ob die Zellen auf die Inhibitor-Behandlung zusätzlich mit einer Reduktion der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge reagieren, wurde der Antikörper α -Ebf1-Y412, Klon 3G5, verwendet. Hierbei zeigten behandelte Zellen eine durchschnittlich um etwa 26 % reduzierte Gesamt-Ebf1-Proteinmenge. Aufgrund der hohen Varianz in der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge in behandelten Zellen muss dieser Versuch jedoch zukünftig wiederholt werden. Eine Analyse der in Abbildung 3.18A exemplarisch dargestellten Zellen mittels quantitativer Realtime-PCR zeigte eine leicht reduzierte Ebf1-Transkriptmenge in behandelten Zellen (etwa 1,2-fach; Abbildung 3.18C).

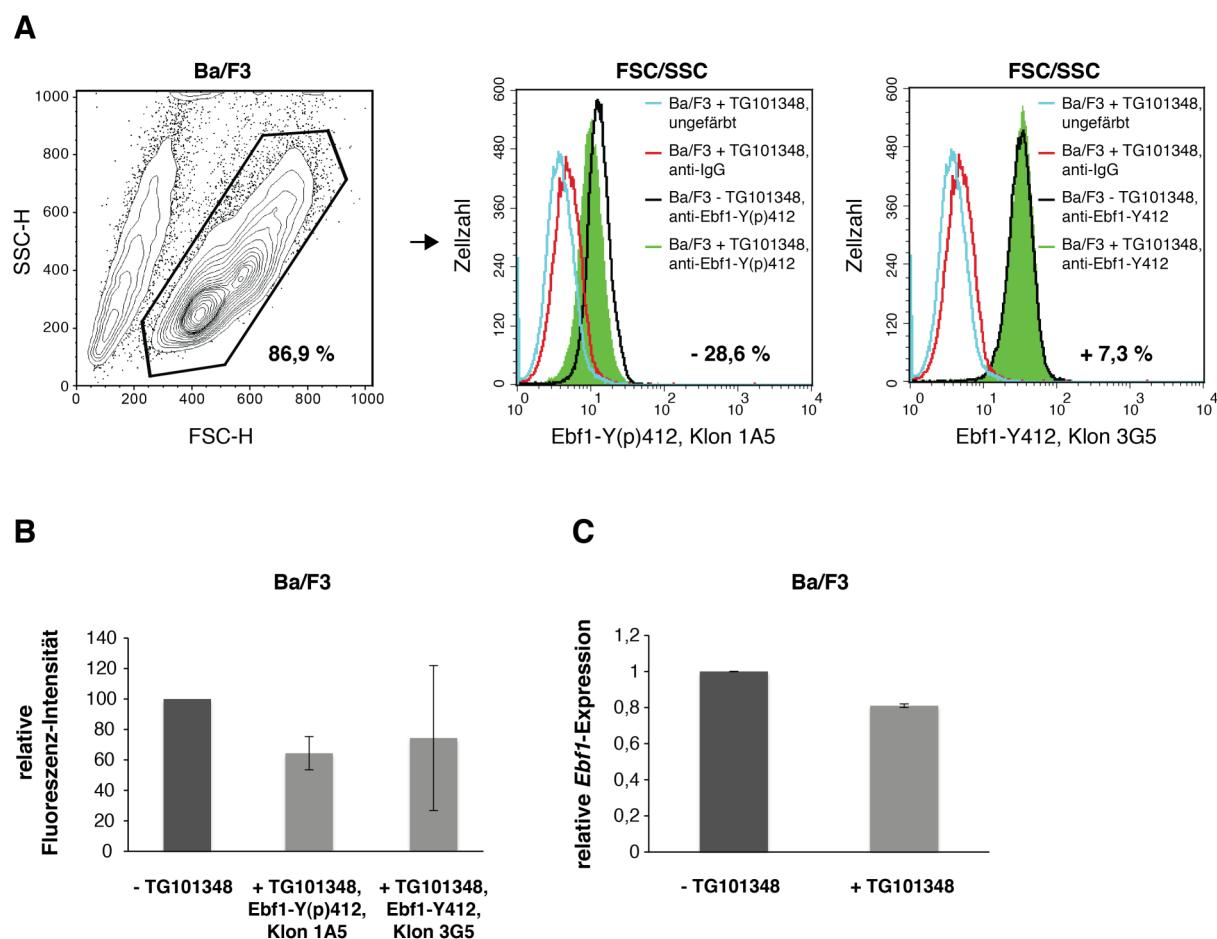


Abbildung 3.18: Die Inhibition von Jak-Kinasen resultierte in einer verminderten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in Ba/F3-Zellen

A: Intrazelluläre Analyse der Ebf1-Y(p)412- und der Gesamt-Ebf1-Proteinmenge in Ba/F3-Zellen 24 h nach der Zugabe des Jak-Inhibititors TG101348 (1000 nM). Verwendet wurden die Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y412, Klon 3G5. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen.

Als Negativkontrolle wurden ungefärbte bzw. mit dem Zweitantikörper gefärbte Zellen verwendet. **B:** Relative Fluoreszenz-Intensität (in %) von Ebf1-Y(p)412 und Ebf1-Y412 in Ba/F3-Zellen 24 h nach der Inhibitor-Zugabe (s. A). Die Fluoreszenz-Intensität nicht stimulierter Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. n = 2. **C:** Analyse der *Ebf1*-Expression der in (A) exemplarisch dargestellten behandelten und nicht behandelten Zellen mittels quantitativer Realtime-PCR. Als Referenzgen zum Zweck der Normalisierung diente *β-Aktin*. Der Wert nicht behandelter Zellen wurde gleich 1 gesetzt.

Bisherige Ergebnisse dieser Arbeit deuten daher darauf hin, dass eine exogene IL-7-Stimulation in einer erhöhten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge resultiert (s. Abbildung 3.17), während eine Inhibition der in der IL-7-vermittelten Signalübertragung involvierten Jak-Kinasen zu einer Reduktion der Phosphorylierungsmenge führte.

3.2 Untersuchungen zur Redundanz von Ebf-Proteinen

Wie bereits beschrieben sind Ebf-Proteine sowohl untereinander als auch evolutionär hoch konserviert (Dubois & Vincent, 2001). Zudem zeigen die Ebf-Proteine in vielen murinen Geweben eine simultane und überlappende Expression, wodurch Analysen potentiell redundanter Wirkungsweisen erschwert werden (Garel *et al.*, 1997; Malgaretti *et al.*, 1997; Mella *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1997, 2002 & 2004; Dubois & Vincent, 2001; Jin *et al.*, 2010). In B-Zellen hingegen ist *Ebf1* als einziges Mitglied der Ebf-Familie exprimiert (Wang *et al.*, 2004; persönliche Kommunikation Bettina Groll, HMGU München). Da durch eine ektopische *Ebf1*-Expression in *Ebf1*-defizienten Zellen die arretierte B-Zell-Differenzierung wiederhergestellt werden kann (s. Abbildung 3.9 und Pongubala *et al.*, 2008), wurde dieses experimentelle System verwendet, um am Beispiel der B-Zell-Differenzierung eine potentiell redundante Wirkungsweise der murinen Ebf-Proteine zu untersuchen.

3.2.1 Analysen zur potentiell redundanten Wirkungsweise von Ebf-Proteinen in der B-Zell-Differenzierung

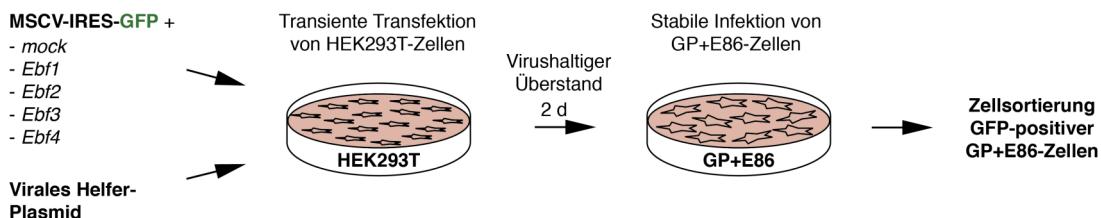
3.2.1.1 Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen

Zur Analyse einer möglichen redundanten Wirkungsweise der Ebf-Proteine in der B-Zell-Differenzierung wurde untersucht, ob durch die ektopische Expression der Ebf-Proteine 2-4 in *Ebf1*-defizienten Zellen aus der fötalen Leber das *in vitro*-B-Zell-Differenzierungs-Potential dieser Zellen wiederhergestellt wird.

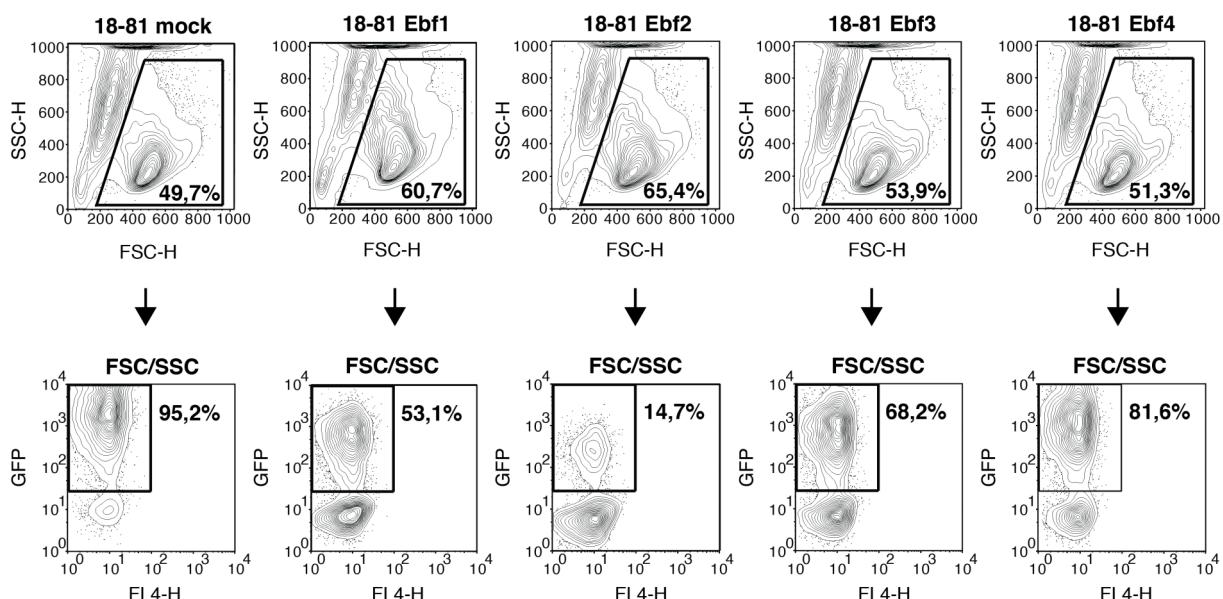
Hierzu wurden zunächst mithilfe der Plasmide MSCV-*Ebf2*-IRES-*Gfp*, MSCV-*Ebf3*-IRES-*Gfp* oder MSCV-*Ebf4*-IRES-*Gfp* Retrovirus-verpackende GP+E86-Zellen nach oben beschriebener Methode (s. S. 83) hergestellt (Abbildung 3.19A). Als Negativ- bzw.

Positivkontrolle für nachfolgende Versuche wurden Retrovirus-verpackende GP+E86-Zellen für *mock* bzw. *Ebf1* verwendet (s. S. 83).

A



B



C

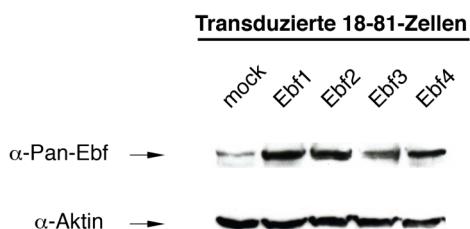


Abbildung 3.19: Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen

A: Schematische Darstellung zur Herstellung Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen. Zunächst wurden HEK293T-Zellen mit MSCV-*mock*-, -*Ebf1*-, -*Ebf2*-, -*Ebf3*- oder -*Ebf4*-IRES-*Gfp* sowie einem viralen Helfer-Plasmid transient transfiziert. Der Viruspartikel-haltige Zellkulturüberstand der HEK293T-Zellen wurde anschließend zur Infektion von GP+E86-Zellen verwendet. Infizierte GP+E86-Zellen wurden, basierend auf der Expression von *Gfp*, 2-3 x mittels Durchflusszytometrie sortiert. **B:** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Transduktionsraten, gemessen anhand der *Gfp*-Expression, von 18-81-Zellen nach 48-stündiger Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden

GP+E86-Zellen. **C:** Repräsentative Western Blot-Analyse der Ebf-Proteinmenge in transduzierten 18-81-Zellen unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers. Als Vergleich dienten *mock*-transduzierte Zellen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

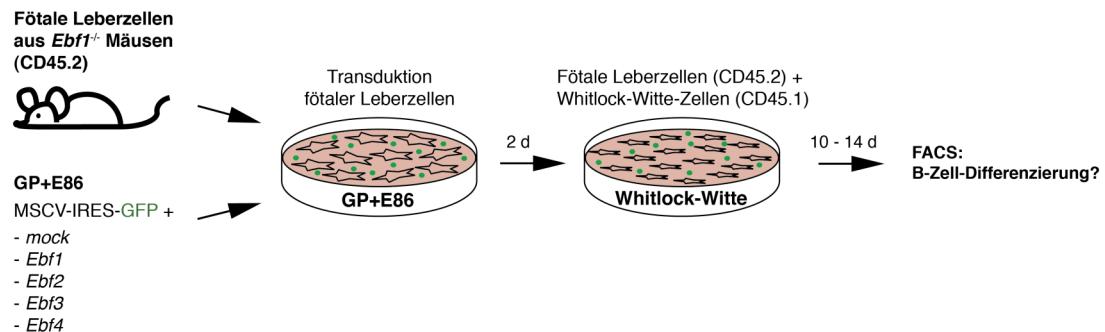
Die Funktionalität generierter Retrovirus-verpackender GP+E86-Zellen wurde mittels Transduktion der Prä-B-Zelllinie 18-81 überprüft. Hierzu wurden 18-81-Zellen für 48 h mit den GP+E86-Zellen kokultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Transduktionsraten mittels durchflusszytometrischer Analyse der *Gfp*-Expression in den 18-81-Zellen (Abbildung 3.19B). Durch die Kokultivierung mit den verschiedenen GP+E86-Zellen konnten Transduktionsraten der 18-81-Zellen zwischen etwa 15 - 95 % beobachtet werden. Zur Bestimmung der *Ebf*-Überexpression wurden Protein-Extrakte transduzierter Zellen unter Verwendung des α -Pan-Ebf-Antikörpers im Western Blot analysiert (Abbildung 3.19C). Während in Protein-Extrakten aus mit MSCV-*mock*-IRES-*Gfp* transduzierten Zellen wie erwartet lediglich eine schwache Bande detektiert werden konnte, die vermutlich endogenem *Ebf1* entspricht, zeigten mit MSCV-*Ebf1*-, -*Ebf2*-, -*Ebf3*- oder -*Ebf4*-IRES-*Gfp* transduzierte Zellen eine deutliche Ebf-Überexpression.

Die erfolgreich generierten Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen wurden nachfolgend für Versuche zur *in vitro*-B-Zell-Differenzierung verwendet.

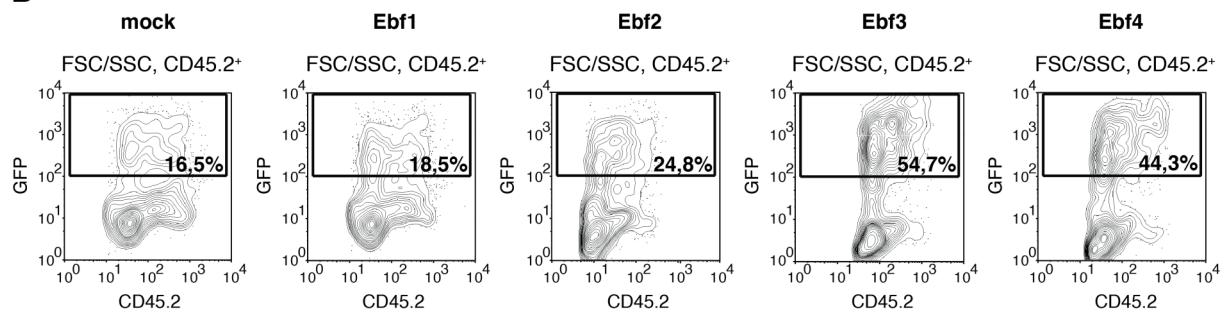
3.2.1.2 *Ebf2*-, *Ebf3*- und *Ebf4*-transduzierte fötale Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung

Um zu analysieren, ob die verschiedenen Ebf-Proteine die *in vitro*-B-Zell-Differenzierung *Ebf1*-defizienter Zellen wiederherstellen, wurden fötale Leberzellen (CD45.2) aus *Ebf1*-defizienten Mausembryonen (E16,5 - E17,5) isoliert und mittels 48-stündiger Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen für MCV-*mock*-, -*Ebf1*-, -*Ebf2*-, -*Ebf3*- oder -*Ebf4*-IRES-*Gfp* (s. Abbildung 3.19) unter Zugabe von IL-3, IL-6 und SCF transduziert (Abbildung 3.20A). Im Anschluss an die retrovirale Transduktion wurden die Transduktionsraten fötaler Leberzellen anhand der *Gfp*-Expression bestimmt. Durch die Kokultivierung der Zellen mit den verschiedenen GP+E86-Zellen konnten Transduktionsraten zwischen durchschnittlich etwa 20-51 % beobachtet werden (Abbildung 3.20B + C).

A



B



C

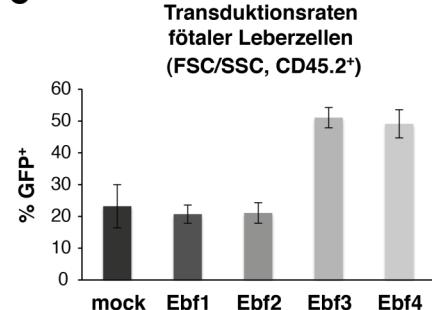


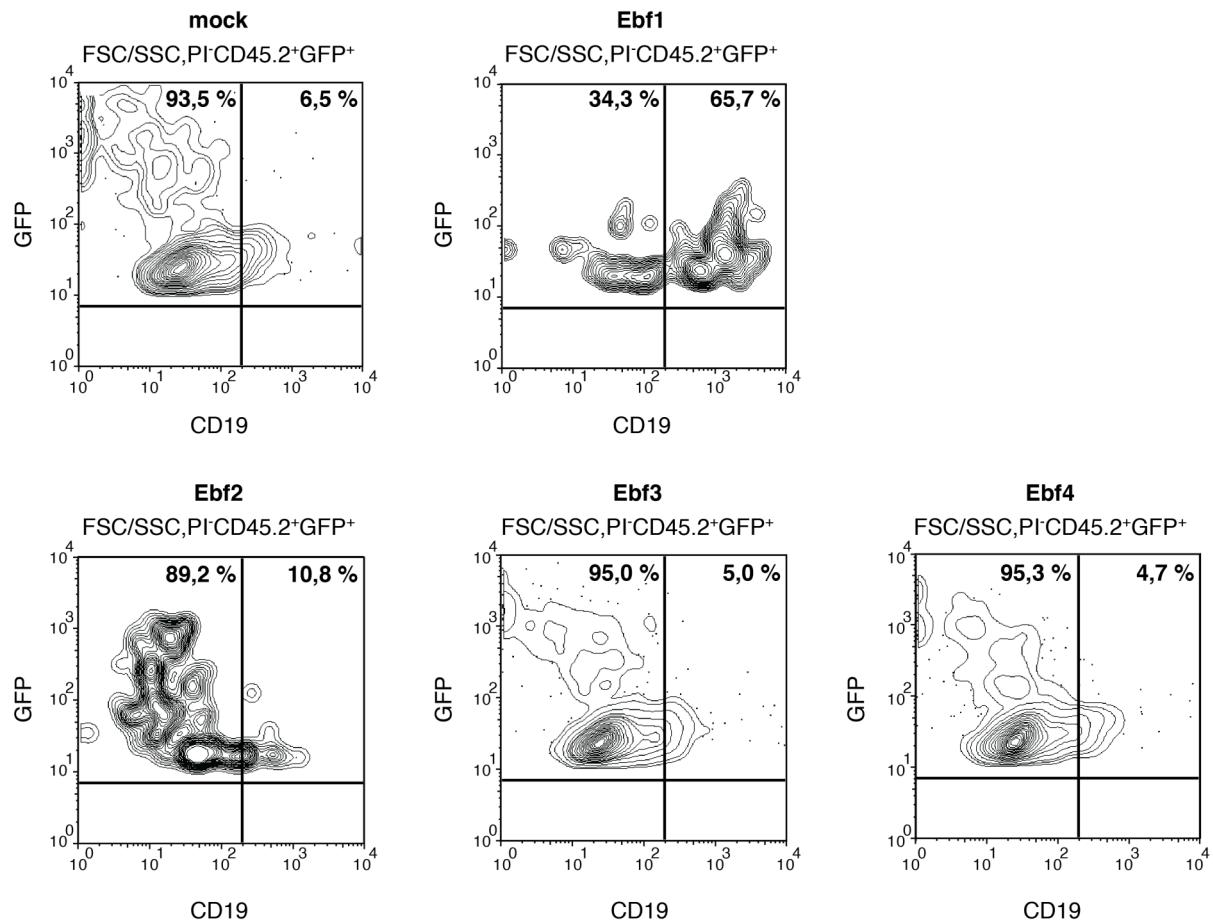
Abbildung 3.20: Retrovirale Transduktion *Ebf1*-defizienter Leberzellen und Kokultivierung mit Whitlock-Witte-Zellen

A: Schematische Darstellung des experimentellen Systems zur Untersuchung der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung. Fötale Leberzellen (CD45.2) aus *Ebf1*-defizienten Mausembryonen (E16,5 - E17,5) wurden mittels einer zweitägigen Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen retroviral transduziert. Nach der Bestimmung der Transduktionsraten (s. B) wurden die fötalen Leberzellen für 10-14 d mit Whitlock-Witte-Zellen (CD45.1) kokultiviert. Nach 10-14 d erfolgte die Analyse der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung mittels Durchflusszytometrie. **B:** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Transduktionsraten, gemessen anhand der *Gfp*-Expression, fötaler Leberzellen nach 48-stündiger Kokultivierung mit Retrovirus-verpackenden GP+E86-Zellen. **C:** Transduktionsraten fötaler Leberzellen (s. B). n = 3

Im Anschluss an die zweitägige retrovirale Transduktion der fötalen Leberzellen wurden diese nach oben beschriebener Methode (s. S. 86) mit Whitlock-Witte-Zellen (CD45.1) kokultiviert.

Die *in vitro*-B-Zell-Differenzierung der hämatopoietischen Zellen wurde nach 10-14 d anhand der CD19-Expression transduzierter fötaler Leberzellen am Durchflusszytometer analysiert (Abbildung 3.21A + B).

A



B

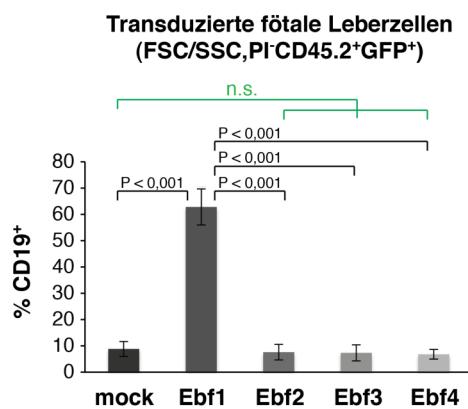


Abbildung 3.21: Ebf2-, Ebf3- und Ebf4-transduzierte fötale Leberzellen aus Ebf1-defizienten Mäusen zeigen einen Defekt in der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung

A: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung, gemessen anhand der CD19-Expression, transduzierter fötaler Leberzellen (FSC/SSC, PI⁻CD45.2⁺GFP⁺) nach der

Kokultivierung mit Whitlock-Witte-Zellen (13 d). **B:** Prozentualer Anteil CD19-positiver Zellen an transduzierten fötalen Leberzellen (s. A). n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$). n = 3

Wie bereits in Abbildung 3.9 gezeigt, konnte durch eine ektopische *Ebf1*-Expression in *Ebf1*-defizienten fötalen Leberzellen die B-Zell-Differenzierung wiederhergestellt werden (durchschnittlich etwa 63 % CD19-positive transduzierte fötale Leberzellen). Hingegen führte eine ektopische Expression von *Ebf2*, *Ebf3* oder *Ebf4* nicht zu einem erhöhten Anteil CD19-positiver Zellen (durchschnittlich zwischen etwa 6,8 - 7,6 % CD19-positive Zellen) gegenüber *mock*-transduzierten Zellen, die wie erwartet nicht in die Hardy-B-Zellfraktion B differenzierten (durchschnittlich etwa 8 % CD19-positive Zellen).

In diesem experimentellen System konnte somit gezeigt werden, dass keines der anderen Proteine der Ebf-Familie die Funktion von *Ebf1* in der B-Zell-Differenzierung übernehmen konnte.

3.2.2 Analysen zur Transaktivierung B-Zell-spezifischer Gene durch die Ebf-Proteine

3.2.2.1 Ebf2, Ebf3 und Ebf4 transaktivieren den *Lambda5*-Promotor in Ba/F3-Zellen

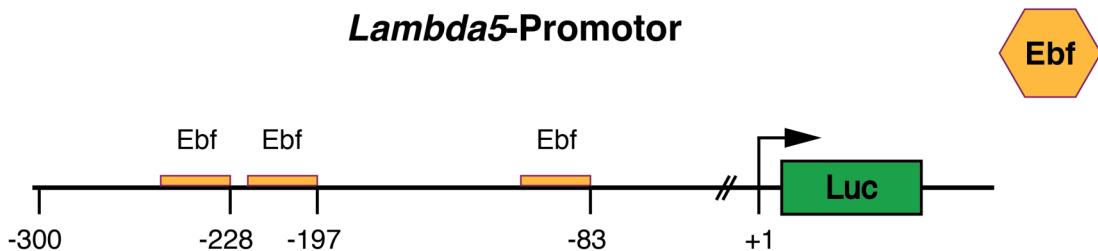
Um eine potentiell redundante Wirkungsweise der Ebf-Proteine in der Transaktivierung des B-Zell-spezifischen Gens *Lambda5* zu untersuchen, wurden Luziferase-Reporter-Assays durchgeführt. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass *Ebf2* eine dem *Ebf1* vergleichbare Induktion des *Lambda5*-Promotors bewirkt (Hiechinger, 2010).

Zur Untersuchung des *Lambda5*-Transaktivierungspotentials sämtlicher Ebf-Proteine aus *M. musculus* wurden Ba/F3-Zellen transient mit den Expressionsplasmiden pCMV-*mock*, -*Ebf2*, -*Ebf3* oder -*Ebf4* sowie dem Reporter-Konstrukt pBL-*Lambda5-Luc* transfiziert (Abbildung 3.22A). Als Vergleich dienten mit pCMV-*Ebf1* transfizierte Zellen, da in diesen die Induktion des Reporter-Plasmids bereits gezeigt werden konnte (s. Abbildung 3.13). Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pBL-*Luc* verwendet. Zur Normalisierung der Luziferase-Aktivität wurden die Ba/F3-Zellen zusätzlich mit dem pCMV-basierten Expressionsplasmid für *LacZ* transfiziert.

Dargestellt in Abbildung 3.22B ist die relative Induktion des *Lambda5*-Promotors durch *Ebf1-4*, gemessen anhand der Luziferase-Aktivität in Ba/F3-Zellen 48 h nach der Transfektion. Der *Lambda5*-Promotor konnte durch sämtliche Ebf-Proteine transaktiviert

werden (zwischen etwa 4,3 - 10-fach). Zwischen den Ebf-Proteinen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Transaktivierung beobachtet werden.

A



B

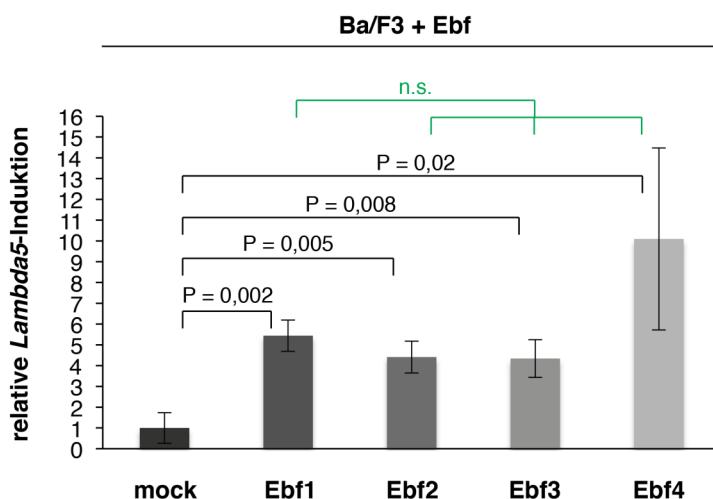


Abbildung 3.22: Transaktivierung des *Lambda5*-Promotors durch Ebf2, Ebf3 und Ebf4 in Ba/F3-Zellen

A: Schematische Darstellung zur Durchführung des Luziferase-Reporter-Assays unter Verwendung von pCMV-basierten Expressionsplasmiden für die Ebf-Proteine und des Reporter-Plasmids pBL-*Lambda5-Luc*. Die enthaltenen Ebf-Bindestellen im Reporter-Plasmid sind schematisch dargestellt (modifiziert nach Sigvardsson *et al.*, 1997). **B:** Relative Induktion des *Lambda5*-Promotors durch Ebf1-4, gemessen anhand der Luziferase-Aktivität in Ba/F3-Zellen 48 h nach der Transfektion. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pBL-*Luc* verwendet. Erhaltene Luziferase-Werte wurden zunächst mittels der β -Galaktosidase-Aktivität und anschließend mittels der Luziferase-Aktivität in mit dem Leervektor pBL-*Luc* transfizierten Ba/F3-Zellen normalisiert. Zur Analyse der relativen Induktion des *Lambda5*-Promotors wurde die Induktion in pCMV-mock transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. n.s. = nicht signifikant ($P > 0,05$). $n = 3$

3.2.2.2 Proteine der Ebf-Familie zeigten ein unterschiedliches Potential zur Transaktivierung von *VpreB* und *Mb-1* in Ba/F3-Zellen

Zur weitergehenden Analyse redundanter Wirkungsweisen der Ebf-Proteine wurde in Ba/F3-Zellen die Ebf1-4-induzierte Expression der B-Zell-spezifischen Gene *VpreB* und *Mb-1* untersucht (Abbildung 3.23).

Hierzu wurden Ba/F3-Zellen transient mit den Expressionsplasmiden pCMV-*Ebf2*, -*Ebf3* und -*Ebf4* transfiziert. Als Vergleich dienten *Ebf1*-transfizierte Zellen, da in diesen die Induktion von *VpreB* und *Mb-1* bereits gezeigt werden konnte (s. Abbildung 3.14). Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor (*mock*) transfiziert.

Die Analyse der *VpreB*- und *Mb-1*-Expression erfolgte 48 h nach der Transfektion mittels quantitativer Realtime-PCR. Zum Zweck der Normalisierung wurde die *Ebf*-Expression in mit pCMV-*Ebf1*, -*Ebf2*, -*Ebf3* und -*Ebf4* transfizierten Zellen angeglichen und jeweils gleich 1 gesetzt. Im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle konnte in diesen Zellen eine etwa 2000-fach erhöhte *Ebf*-Expression gemessen werden (Abbildung 3.23A).

Zur Analyse der relativen Zielgen-Expression durch Ebf2-4 (Abbildung 3.23B + C) wurde der Wert der mit *Ebf1* transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. Hierbei konnte in einer ersten Analyse ein unterschiedliches Transaktivierungspotential der Ebf-Proteine gezeigt werden. Obwohl alle Ebf-Proteine eine gegenüber *mock*-transfizierten Zellen, die lediglich endogenes *Ebf1* exprimieren, erhöhte *VpreB*- und *Mb-1*-Expression zeigten, divergierte die Induktion von *VpreB* durch die verschiedenen Ebf-Proteine zwischen etwa 5- bis 35-fach und für *Mb-1* zwischen etwa 6- bis 42-fach. Hierbei zeigte sich ein vergleichbares Transaktivierungspotential der Proteine Ebf1 und Ebf2, wobei Ebf2 eine dem Ebf1 gegenüber leicht erhöhte Aktivierung der B-Zell-spezifischen Gene bewirkte (etwa 1,3-fach für *VpreB* und 1,1-fach für *Mb-1*). Für die Proteine Ebf3 und Ebf4 konnte hingegen eine gegenüber Ebf1 etwa 68 - 82 %ige Reduktion der *VpreB*- und eine etwa 73 - 85 %ige Reduktion der *Mb-1*-Expression beobachtet werden.

Dieses Ergebnis muss nochmals bestätigt werden, liefert jedoch einen ersten Hinweis auf die möglicherweise differentielle Transaktivierung der Gene *VpreB* und *Mb-1* durch die verschiedenen Ebf-Proteine.

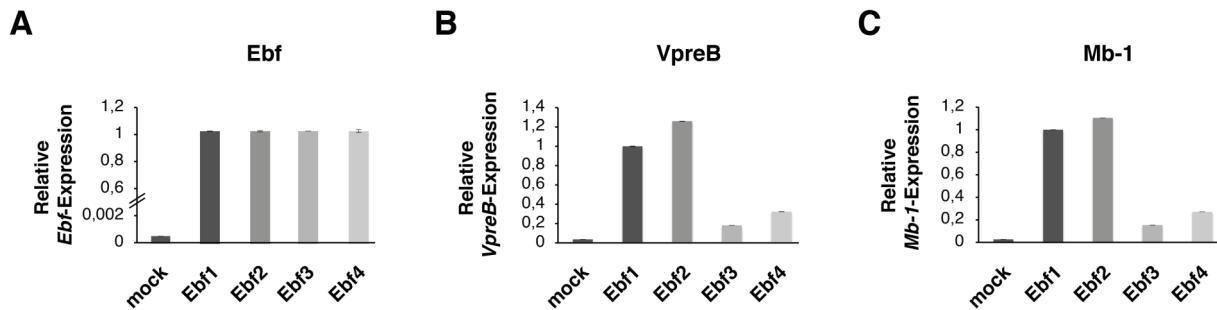


Abbildung 3.23: Ebf-Proteine zeigten ein unterschiedliches Potential zur Transaktivierung der B-Zell-spezifischen Gene *VpreB* und *Mb-1*

A: Analyse der *Ebf*-Expression in transient mit pCMV-*mock*, -*Ebf1*, -*Ebf2*, -*Ebf3* oder -*Ebf4* transfizierten Ba/F3-Zellen 48 h nach der Transfektion mittels quantitativer Realtime-PCR. Als Referenzgen zum Zweck der Normalisierung diente *Hprt*. Der Wert der mit pCMV-*Ebf1*, -*Ebf2*, -*Ebf3* und -*Ebf4* transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. **B + C:** Analyse der *VpreB*- (B) und *Mb-1*- (C) Expression in den unter A beschriebenen Zellen. Erhaltene Werte wurden zunächst mittels der *Hprt*- und anschließend mittels der *Ebf*-Expression normalisiert. Zur Analyse der relativen Expression wurde der Wert der mit pCMV-*Ebf1* transfizierten Zellen gleich 1 gesetzt. n = 1, technisches Triplikat.

4. Diskussion

4.1 Regulation der B-Zell-Differenzierung anhand posttranskriptionaler Modifikationen von Ebf1

4.1.1 Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung

Die frühe B-Zell-Differenzierung wird durch verschiedene Signalwege sowie ein komplexes Netzwerk diverser Transkriptionsfaktoren reguliert. Für den Transkriptionsfaktor Ebf1, der in diesem Prozess eine zentrale Funktion einnimmt, konnten in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal posttranskriptionale Modifikationen identifiziert werden, u.a. die Phosphorylierungsstelle Y412 (s. S. 27; Dr. Gerald Burgstaller & Dr. Hakan Sarioglu, HMGU München, unveröffentlichte Daten). Es ist bekannt, dass Phosphorylierungen maßgeblich die Synthese, Stabilität, Lokalisation, Funktion und Interaktion von Proteinen beeinflussen können (Yaffe & Cantley, 1999; Cohen, 2000; Hunter, 2000; Pawson & Nash, 2000; Schlessinger, 2000; Pawson & Scott, 2005; Gnad *et al.*, 2010). Für den Transkriptionsfaktor E2A beispielsweise, der zusammen mit Ebf1 die Spezifizierung lymphatischer Vorläuferzellen in B-Zellen vermittelt, wird in der B-Zell-Differenzierung ebenfalls eine Regulation über Phosphorylierungen angenommen (Sloan *et al.*, 1996). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Phosphorylierungsstelle Ebf1-Y412 biologisch sowie biochemisch charakterisiert, um somit zu einem besseren Verständnis der Regulation und Funktion von Ebf1 in der B-Zell-Differenzierung zu gelangen. Erste Hinweise auf eine funktionelle Relevanz dieser Phosphorylierungsstelle lieferten hierbei Analysen der Massenspektrogramme der murinen Prä-B-Zelllinie 18-81, in denen lediglich eine kleine Fraktion der Ebf1-Proteine an dieser Position phosphoryliert zu sein scheint, was auf einen regulierten Prozess der Ebf1-Y412-Phosphorylierung in der murinen B-Zell-Differenzierung hindeutet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Phosphorylierungsstelle Y412 des Ebf1 zunächst mittels des neu generierten Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, welcher eine hohe Präferenz für phosphoryliertes Ebf1-Y412 zeigte, weitergehend verifiziert (Abbildung 3.1). Hierbei konnte sowohl in transient mit *Ebf1* transfizierten HEK293T- als auch in 18-81-Zellen die Ebf1-Y412-Phosphorylierung bestätigt werden. Während die Massenspektrometrie jedoch mit immunpräzipitiertem Ebf1-Flag aus 18-81-Zellen erfolgte, wurden in der vorliegenden Arbeit untransfizierte 18-81-Zellen verwendet, sodass erstmals die Phosphorylierung des endogenen Ebf1 gezeigt werden konnte. Der generierte phosphospezifische Antikörper erwies sich

hierbei nicht nur im Western Blot, sondern auch in der intrazellulären Durchflusszytometrie als funktionell, und erkennt somit ebenfalls das native Ebf1-Protein. Dies liefert einen zusätzlichen Hinweis auf die Phosphorylierung des Ebf1-Y412, da die Zugänglichkeit von Aminosäuren eine Voraussetzung für Phosphorylierungen darstellt (Gnad *et al.*, 2007).

Zur weiteren Verifizierung der Ebf1-Y412-Phosphorylierung wurde immunpräzipitiertes Ebf1 aus der B-Zelllinie 18-81 ebenfalls unter der Verwendung eines Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers im Western Blot analysiert (Abbildung 3.2). Hierbei konnte ein Phosphotyrosin-Protein detektiert werden, das der molekularen Masse von Ebf1 entspricht. Obwohl der verwendete Antikörper keine Spezifität für Ebf1-Y(p)412 zeigt, sondern lediglich generell Phosphotyrosin-Proteine detektiert, liefert dieses Experiment einen weiteren Hinweis auf die Ebf1-Y412-Phosphorylierung. So konnte mittels Massenspektrometrie keine weitere Tyrosin-Phosphorylierung identifiziert werden, wobei jedoch sieben der insgesamt 14 Tyrosine des Ebf1 nicht durch die Massenspekrogramme erfasst werden konnten. Allerdings zeigten Analysen von mehr als 2000 Phospho-Proteinen in HeLa-Zellen, dass lediglich 1,8 % aller Tyrosine phosphoryliert waren, da Tyrosine aufgrund ihrer eher hydrophoben Eigenschaften tendenziell in weniger zugänglichen Protein-Regionen lokalisiert sind (Olsen *et al.*, 2006; Gnad *et al.*, 2007).

Für die Ebf1-Y412-Phosphorylierung spricht des Weiteren die hohe Konservierung des Y412 innerhalb der murinen Ebf-Proteinfamilie sowie in verschiedenen Verte- und Invertebraten (Abbildung 3.3), da gezeigt werden konnte, dass Phosphorylierungsstellen in vielen höheren Spezies generell eine höhere evolutionäre Konservierung aufweisen als strukturell ähnliche nicht phosphorylierte Stellen desselben Proteins (Gnad *et al.*, 2007 & 2010). Ob die Aminosäure Y412 in anderen murinen Ebf-Proteinen sowie den Ebf1-Orthologen anderer Spezies ebenfalls durch Phosphorylierung modifiziert werden kann, ist bisher nicht bekannt. Posttranskriptionale Modifikationen werden bekanntermaßen durch umgebende Peptidsequenzen, dem so genannten Akzeptor-Motiv, beeinflusst (Blom *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2006; Gnad *et al.*, 2007). Erste Hinweise auf eine potentielle Phosphorylierung des Y412 des humanen Ebf1, das in umgebenden Peptidsequenzen identisch mit dem murinen Ebf1 ist, lieferten durchflusszytometrische Analysen untransfizierter HEK293T-Zellen unter Verwendung des Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5 (Abbildung 3.1E). In diesen humanen Zellen, welche endogen *Ebf1* exprimieren (persönliche Kommunikation Bettina Groll, HMGU München), konnte gegenüber mit dem Zweitantikörper gefärbten Zellen eine erhöhte Fluoreszenz-Intensität beobachtet werden. Ob der Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon

1A5, jedoch für humanes Ebf1 eine entsprechend hohe Phosphospezifität wie für das murine Ortholog zeigt, wurde bislang nicht analysiert.

Interessanterweise scheint das Ebf-Ortholog Collier in *D. melanogaster* ebenfalls an der Immunantwort beteiligt zu sein. Collier ist hierbei von essentieller Funktion für die Entwicklung von Lamellozyten, einem Zelltyp der Hämolymphe, nach einem Befall der Larven durch parasitäre Wespen (Shrestha & Gateff, 1982; Rizki & Rizki, 1984; Russo *et al.*, 1996; Crozatier *et al.*, 2004; Krzemien *et al.*, 2007). Da *Collier*-defizierte Larven nach einem Parasiten-Befall keine Lamellozyten bilden können (Crozatier *et al.*, 2004), wäre es interessant zu untersuchen, ob Collier ebenfalls diese Tyrosin-Phosphorylierung aufweist und ob diese, ähnlich wie die Ebf1-Y412-Phosphorylierung in der murinen B-Zell-Differenzierung, wichtig für die Bildung von Lamellozyten ist.

4.1.2 Der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstatus während der B-Zell-Differenzierung

Ebf1 ist in wt-Mäusen in allen B-Zell-Stadien, mit Ausnahme von Plasmazellen, sowie bereits in CLPs exprimiert (Abbildung 4.1, S. 120; Hagman *et al.*, 1993; Igarashi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Rumfelt *et al.*, 2006; Roessler *et al.*, 2007; Inlay *et al.*, 2009; Mansson *et al.*, 2010; Tsapogas *et al.*, 2011). Wie schon beschrieben, scheint Ebf1 bereits in CLPs die Initiierung des B-Zell-Differenzierungsprogramms zu vermitteln. In *Ebf1*-defizienten Mäusen ist die B-Zell-Differenzierung jedoch nicht im CLP-Stadium, sondern im Prä-Pro-B-Zellstadium (Fraktion A) arretiert (Lin & Grosschedl, 1995; Zandi *et al.*, 2008; Tsapogas *et al.*, 2011), sodass die Initiation der *Ebf1*-Expression in CLPs nicht vollständig mit der arretierten B-Zell-Differenzierung korreliert. Daher wurde bereits 2008 von Zandi *et al.* darüber spekuliert, ob die vollständige Funktion von Ebf1 in der frühen B-Zell-Differenzierung durch beispielsweise posttranskriptionale Modifikationen reguliert wird.

Diese Theorie wird durch die hier durchgeführten Analysen des Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstatus während der B-Zell-Differenzierung, dessen Regulierung sowie der biologischen und biochemischen Funktion weiter unterstützt. So deuten bisherige Ergebnisse auf eine Ebf1-Y412-Phosphorylierung präferentiell in frühen B-Zell-Stadien hin. Hierbei konnte mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie unter Verwendung des Antikörpers α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, eine Phosphorylierung in Gesamt-Knochenmarks-, jedoch kaum in Gesamt-Milzzellen, detektiert werden (Abbildung 3.4). Unter diesen Zellen befinden sich lediglich die Hardy-B-Zell-Fraktionen E und F, nicht jedoch die frühen B-Zellstadien A-D

(Allman *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis wird durch Analysen sortierter Hardy-B-Zell-Fraktionen weiter unterstützt. Diese deuten auf eine Ebf1-Y412-Phosphorylierung in den Fraktionen A-E hin (Abbildung 3.6 und Abbildung 4.1, S. 120). In Fraktion F hingegen konnte, obwohl in diesen Zellen im Vergleich zu Fraktion E eine höhere Ebf1-Transkriptmenge nachgewiesen wurde, keine Ebf1-Y412-Phosphorylierung detektiert werden. Zusammen mit den Ergebnissen der Massenspektrometrie, laut derer in der Prä-B-Zelllinie 18-81 nur eine kleine Fraktion der Ebf1-Proteine an Y412 phosphoryliert zu sein scheint, deutet dies auf eine differentielle Regulation dieser Phosphorylierung während der B-Zell-Differenzierung hin. Diese Resultate sollen in zukünftigen Experimenten weiter bestätigt werden sowie durchflusszytometrische Analysen der Fraktionen E und F erfolgen. Um Fraktion C, deren geringe Frequenz im murinen Knochenmark bisherige Analysen erschwerte, hinsichtlich der Ebf1-Y412-Phosphorylierung zu untersuchen, soll diese Fraktion in zukünftigen Versuchen durch die Isolation aus mehreren Mäusen analysiert werden. Alternativ soll die intrazelluläre Durchflusszytometrie ohne vorhergehende Sortierung erfolgen, um den Verlust von Zellen während dieses Prozesses zu vermeiden. Hierbei können die Gesamt-Knochenmarkszellen vor der intrazellulären Färbung des Ebf1-Y(p)412 mit den entsprechenden Antikörpern gegen die Oberflächen-Antigene B220, CD43, CD24 und BP-1 gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Des Weiteren könnten die Analysen des Gesamt-Knochenmarks und der -Milz sowie der Hardy-B-Zell-Fraktionen C-F weiter verbessert werden, wenn die Antikörper α -Ebf1-Y(p)412, Klon 1A5, und α -Ebf1-Y(p)412, Klon 3G5, kovalent an Biotin oder direkt an ein Fluorochrom konjugiert werden. Hierdurch könnten unspezifische Signale, die durch die alleinige Verwendung des Zweitantikörpers in diesen Zellen beobachtet wurden, reduziert werden.

4.1.3 Die biologische Funktion der Ebf1-Y412-Phosphorylierung für die B-Zell-Differenzierung

Da durch eine differentielle Regulation der Ebf1-Y412-Phosphorylierung die Funktion von Ebf1 gesteuert werden könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit die biologische Relevanz der Ebf1-Y412-Phosphorylierung für die Entwicklung von B-Zellen analysiert. Hierzu wurde mittels Punktmutagenese das Tyrosin an Position 412 des Ebf1 durch die nicht phosphorylierbare Aminosäure Phenylalanin substituiert. Hierbei handelt es sich um eine gängige Aminosäuresubstitution zur Analyse von potentiell relevanten Phosphorylierungsstellen, da Phenylalanin, wie beispielsweise von Weinmaster *et al.* (1984)

beschrieben, die größte strukturelle Ähnlichkeit zu Tyrosin aufweist, sodass die native Struktur des Ebf1 möglichst nicht beeinflusst werden sollte. Dennoch sollte ausgeschlossen werden, dass die Aminosäure-Substitution zu einer veränderten subzellulären Lokalisation des nukleären Transkriptionsfaktors durch Konformationsänderungen oder Zerstörung eines nukleären Lokalisationssignals führt. Subzelluläre Lokalisationsstudien mithilfe von transient mit *Ebf1*-Y412F transfizierten HEK293T-Zellen zeigten hierbei eine dem wt-Ebf1 entsprechende Lokalisation des mutierten Transkriptionsfaktors in der Kernfraktion (Abbildung 3.11). Weiterhin spricht die dem wt-Ebf1 vergleichbare Bindeaktivität von Ebf1-Y412 an die Ebf1-Bindestelle des *Mb-1*-Promotors gegen elementare Konformationsänderungen in Folge der Aminosäure-Substitution (Abbildung 3.12).

Zur Untersuchung der biologischen Relevanz der Ebf1-Y412-Phosphorylierung wurde das Potential *Ebf1*-Y412F-transduzierter fötaler Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen zur *in vitro*- und *in vivo*-B-Zell-Differenzierung analysiert. Durch Analyse der *CD19*-Expression, eines Oberflächenantigens, das vom Pro-B-Zellstadium (Fraktion B) an während der gesamten B-Zell-Differenzierung exprimiert wird (Rolink *et al.*, 1993a, 1994a, 1994b & 1996; Chen *et al.*, 1994), konnte gezeigt werden, dass mit *Ebf1*-Y412F transduzierte hämatopoietische Vorläuferzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen einen Defekt in der *in vitro* B-Zell-Differenzierung aufweisen (Abbildung 3.9). Wie bereits von Pongubala *et al.* (2008) beschrieben, wurde durch eine ektopische *Ebf1*-Expression in *Ebf1*-defizienten fötalen Leberzellen die B-Zell-Differenzierung wiederhergestellt (durchschnittlich etwa 63 % CD19-positive transduzierte fötale Leberzellen). Hingegen führte eine ektopische Expression von *Ebf1*-Y412F nicht zu einem signifikant erhöhten Anteil CD19-positiver Zellen (durchschnittlich etwa 10 % CD19-positive Zellen) gegenüber *mock*-transduzierten Zellen (durchschnittlich etwa 8 % CD19-positive Zellen).

Durch Transplantation transduzierter fötaler Leberzellen in letal bestrahlte wt-Mäuse konnte der *in vitro* beobachtete Defekt in der B-Zell-Differenzierung weitergehend analysiert werden (Abbildung 3.10). Hierzu wurde sowohl die *CD19*-Expression als auch die Expression von *B220* untersucht, eines Oberflächen-Antigens, das ab dem Prä-Pro-B-Zellstadium (Fraktion A) an während der gesamten B-Zell-Differenzierung exprimiert wird (Coffman, 1982; Hardy *et al.*, 1991). Wie bereits *in vitro* gezeigt wurde, konnte durch die ektopische Expression von *Ebf1* in *Ebf1*-defizienten Zellen auch *in vivo* die B-Zell-Differenzierung wiederhergestellt werden (durchschnittlich etwa 87 % B220-positive und 93 % CD19-positive Zellen). Demgegenüber zeigten mit *Ebf1*-Y412F transduzierte Zellen ein durchschnittlich um etwa 75 % reduziertes *in vivo*-B-Zell-Differenzierungs-Potential. So war der Anteil B220-

und CD19-positiver Zellen gegenüber *mock*-transduzierten Zellen (durchschnittlich etwa 8 % B220-positive und 3 % CD19-positive Zellen) zwar signifikant erhöht, jedoch zeigten nur 25 % bzw. 19 % der *Ebf1-Y412F*-transduzierten Zellen eine *B220*- bzw. *CD19*-Expression. Obwohl die *CD19*-Expression dieser Zellen deren Differenzierung in Pro-B-Zellen (Hardy-B-Zell-Fraktion B) zeigt, demonstriert die lediglich partielle Wiederherstellung der B-Zell-Differenzierung die funktionelle Relevanz der *Ebf1-Y412*-Phosphorylierung für die Entwicklung von B-Zellen (Abbildung 4.1). Ob diese Zellen auch spätere B-Zell-Stadien durchlaufen oder möglicherweise ebenfalls eine arretierte B-Zell-Entwicklung zeigen, soll in zukünftigen Versuchen durch Analyse der *CD24*-, *BP-1*-, *IgM*- und *IgD*-Expression sowie des *VDJ_H*-Rekombinationsstatus untersucht werden.

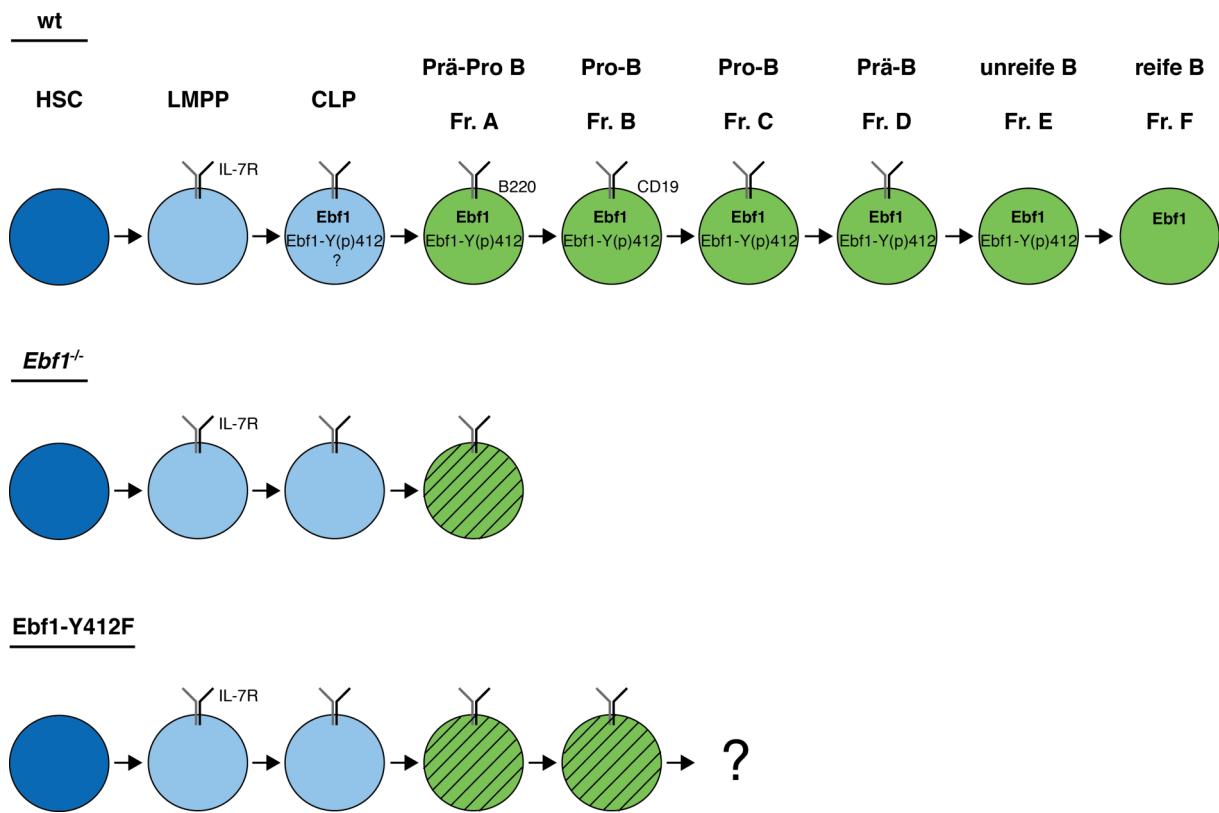


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des *Ebf1-Y412*-Phosphorylierungsstatus während der B-Zell-Differenzierung, der vorhandenen B-Zell-Stadien in wt- und *Ebf1*-defizienten Mäusen sowie des B-Zell-Differenzierungs-Potentials *Ebf1-Y412F*-transduzierter Zellen *in vivo*

Im wt dargestellt sind die detektierte *Ebf1-Y412*-Phosphorylierung in den Fraktionen (Fr.) A-E, die Gesamt-*Ebf1*-Expression während der B-Zell-Differenzierung sowie die Expression des *IL-7Rs*, *B220* und *CD19*. Eine Schraffierung kennzeichnet eine Reduktion in der jeweiligen Fraktion in *Ebf1*-defizienten Tieren sowie *Ebf1-Y412F*-transduzierter Zellen *in vivo* im Vergleich zu wt-Mäusen. HSC = hämatopoietische Stammzelle (*hematopoietic stem cell*); LMPP = lymphoid-geprägter multipotenter Vorläufer (*lymphoid-primed multipotent progenitor*); CLP = gemeinsamer lymphoider Vorläufer (*common lymphoid progenitor*)

In zukünftigen Versuchen sollen bisherige Ergebnisse des Weiteren anhand höherer Tierzahlen weiter bestätigt werden und zudem das experimentelle System zur *in vivo*-B-Zell-Differenzierung dahingehend weiter etabliert werden, dass die Anzahl transduzierter fötaler Leberzellen im Knochenmark rekonstituierter Tiere möglichst erhöht wird. Obwohl auch in wt-Mäusen die frühen Hardy-B-Zell-Fraktionen A-C generell nur in geringer Frequenz im Knochenmark vorhanden sind (Abbildung 3.5), waren besonders *Ebf1*-transduzierte Zellen meist nur in geringer Anzahl im Knochenmark rekonstituierter Tiere detektierbar. Dies könnte in der retroviren Transduktion der Zellen und dem Zeitpunkt der Analyse rekonstituierter Mäuse begründet sein. Da Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren (Rubin & Temin, 1959; Varmus *et al.*, 1977; Roe *et al.*, 1993) und somit präferentiell hämatopoietische Vorläuferzellen anstelle ruhender Stammzellen transduziert werden dürften, könnte die bisherige Analyse nach 4-6 Wochen zu einem Zeitpunkt erfolgt sein, in dem bereits ein Großteil der *Ebf1*-transduzierten Zellen die B-Zell-Differenzierung durchlaufen hat. Um diese Vermutung zu bestätigen, soll daher in Zukunft die Analyse der rekonstituierten Mäuse bereits nach etwa 2-3 Wochen erfolgen. Da Lentiviren in der Lage sind, nicht proliferierende Zellen zu infizieren (Naldini *et al.*, 1996), könnte die Transduktion der fötalen Leberzellen alternativ auch mittels eines lentiviralen Transduktionssystems erfolgen, um ruhende Stammzellen zu transduzieren und somit eine Langzeit-Rekonstitution der Mäuse zu erzielen. Zudem könnte versucht werden, die Transduktionsraten fötaler Leberzellen weiter zu erhöhen oder die Anzahl kotransplantiert Knochenmarkszellen weitmöglichst zu reduzieren, um so die Rekonstitution präferentiell durch transduzierte fötale Leberzellen zu ermöglichen.

Des Weiteren wäre es interessant, Mäuse ebenfalls mit *Ebf1*-Y412D-transduzierten Zellen zu rekonstituieren. Da diese aktivierende Mutante eine Phosphorylierung des *Ebf1*-Y412 imitiert, wäre zu erwarten, dass die B-Zell-Differenzierung in diesen Zellen, ähnlich wie in wt-*Ebf1*-transduzierten Zellen, wiederhergestellt wird.

Zusammenfassend konnte durch die lediglich partielle Wiederherstellung der B-Zell-Differenzierung in *Ebf1*-Y412F-transduzierten Zellen die funktionelle Relevanz dieser Phosphorylierung für die vollständige Aktivität von *Ebf1* in der Hardy-B-Zell-Faktion A gezeigt werden. *Ebf1* wird jedoch, wie bereits erwähnt (s. S. 15 ff.), ebenfalls in CLPs exprimiert und vermittelt in diesen Zellen durch Aktivierung B-Zell-spezifischer Gene die Spezifizierung in B-Zellen, während die Differenzierung in andere Zelltypen unterdrückt wird. Daher soll in Zukunft untersucht werden, ob die *Ebf1*-Y412-Phosphorylierung bereits in diesen Zellen erfolgt und dort ebenfalls von funktioneller Relevanz ist oder ob diese Phosphorylierung lediglich die vollständige Aktivität von *Ebf1* in Fraktion A reguliert.

4.1.4 Die Regulation der Ebf1-Y412-Phosphorylierung während der B-Zell-Differenzierung

Zur Charakterisierung der Regulation der Ebf1-Y412-Phosphorylierung wurden in dieser Arbeit zudem Studien zu potentiell beteiligten Kinasen durchgeführt. Der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstatus sowie der beobachtete Defekt in der frühen B-Zell-Differenzierung *Ebf1*-Y412F-transduzierter Zellen deuteten hierbei auf einen Einfluss IL-7-vermittelte Signalübertragung auf die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge hin. So korreliert die präferentiell in frühen B-Zellstadien detektierte Ebf1-Y412-Phosphorylierung scheinbar nahezu vollständig mit der Expression des *IL-7Rs* (Abbildung 4.1, S. 120). Dieser wird in einer Subpopulation der LMPPs, der CLPs sowie in frühen B-Zell-Stadien exprimiert, jedoch nicht mehr nach der produktiven Umlagerung der leichten Immunglobulinkette, die in Prä-B-Zellen (Fraktion D) initiiert wird (Bossy *et al.*, 1991; Hardy *et al.*, 1991; Henderson *et al.*, 1992; Faust *et al.*, 1993; Kondo *et al.*, 1997; Adolfsson *et al.*, 2005). Des Weiteren ist in *IL-7*- oder *IL7-R α* -defizienten Mäusen die B-Zell-Differenzierung, ähnlich wie in *Ebf1*-defizienten Mäusen, im Prä-Pro-B-Zell-Stadium arretiert (Peschon *et al.*, 1994; von Freeden-Jeffry *et al.*, 1995; Kikuchi *et al.*, 2005) und bisher publizierte Daten lassen vermuten, dass die IL-7-vermittelte Signalübertragung von essentieller Bedeutung für die vollständige Induktion der *Ebf1*-Expression und somit die Initiierung des B-Zell-Differenzierungsprogramms ist (s. S. 23 ff.). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die IL-7-vermittelte Signalübertragung zu einer Aktivierung des Jak/Stat-Signalwegs führt und dass die Expression von *Ebf1* in *IL7-R α* -defizienten Prä-Pro-B-Zellen durch eine ektopische Expression von Stat5 induziert werden kann (Lin *et al.*, 1995; Goetz *et al.*, 2004; Kikuchi *et al.*, 2005; Roessler *et al.*, 2007). Um zu untersuchen, ob die IL-7-vermittelte Signalübertragung ebenfalls die Phosphorylierung von Ebf1-Y412 beeinflusst, wurde die Phosphorylierungsmenge in verschiedenen murinen B-Zelllinien nach einer Stimulation oder Inhibition der IL-7-vermittelten Signalübertragung analysiert.

Hierbei resultierte eine exogene IL-7-Stimulation in einer erhöhten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in den Zelllinien Ba/F3 und 70Z/3 (Abbildung 3.17). Während nach der IL-7-Stimulation in Ba/F3-Zellen jedoch ebenfalls eine erhöhte Gesamt-Ebf1-Menge zu beobachten war, reagierte die Zelllinie 70Z/3 lediglich mit einer Erhöhung der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge bei durchschnittlich gleich bleibender Gesamt-Ebf1-Menge. In der Zelllinie 18-81 hingegen konnte nach der Stimulation mit IL-7 weder eine Zunahme der Gesamt-Ebf1- noch der Ebf1-Y(p)412-Menge beobachtet werden, obwohl eine Expression des *IL-7Rs* in diesen Zellen bereits gezeigt werden konnte (Park *et al.*, 1990). Die

unterschiedliche Reaktion auf die IL-7-Stimulation könnte in dem unterschiedlichen B-Zell-Differenzierungsstatus der transformierten Zelllinien oder deren differentieller Gesamt-Ebf1- und Ebf1-Y(p)412-Menge begründet sein (Abbildung 3.15). Bisherige Ergebnisse deuten darauf hin, dass je höher die Gesamt-Ebf1- sowie die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in den Zellen war, desto weniger reagierten diese auf die IL-7-Stimulation mit einer weiteren Erhöhung der *Ebf1*-Expression und der Ebf1-Y(p)412-Menge.

Einen weiteren Hinweis auf den Einfluss der IL-7-vermittelten Signalübertragung auf die Ebf1-Y412-Phosphorylierung lieferten Analysen der Ebf1-Y(p)412-Menge in Ba/F3-Zellen nach einer Inhibition von Jak-Kinasen mittels des Inhibitors TG101348. Hierbei konnte in Inhibitor-behandelten Zellen durchschnittlich eine Reduktion der Gesamt-Ebf1-Menge sowie der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge beobachtet werden (Abbildung 3.18).

Für eine Jak-vermittelte Ebf1-Y412-Phosphorylierung würde zudem sprechen, dass diese Phosphorylierung mittels Massenspektrometrie von ektopisch exprimiertem *Ebf1* ebenfalls in HEK293T detektiert werden konnte und bekannt ist, dass die Jak-Kinasen, mit Ausnahme von *Jak3*, ubiquitär exprimiert sind (Johnston *et al.*, 1994; Witthuhn *et al.*, 1994; Winston & Hunters, 1995).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine exogene IL-7-Stimulation in einer erhöhten Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge resultiert, während die Inhibition der in der IL-7-vermittelten Signalübertragung involvierten Jak-Kinasen zu einer Reduktion der Ebf1-Y(p)412-Menge führte. Diese Vermutung soll in zukünftigen Versuchen weiter bestätigt werden, u.a. durch Analyse der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge in den Zelllinien Ba/F3 und 70Z/3 nach einer kombinierten IL-7-Stimulation und Behandlung mit dem Jak-Inhibitor TG101348. Zudem sollen neben den verschiedenen Zelllinien auch primäre B-Zellvorläufer aus der Maus isoliert und nach der IL-7-Stimulation bzw. Jak-Inhibitor-Behandlung bezüglich der Ebf1-Y412-Phosphorylierungsmenge analysiert werden.

Interessant wäre es weiterhin zu untersuchen, ob Ebf1 möglicherweise direkt durch Jak-Kinasen phosphoryliert werden kann. Inzwischen wird angenommen, dass die Jak-Kinasen nicht nur in der Aktivierung der Stat-Proteine im Zytoplasma fungieren, sondern auch im Nukleus an der Stabilisierung nuklearer Faktoren sowie an der Chromatin-Modulierung im Zuge der Genaktivierung beteiligt sein können (Nilsson *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006; Li, 2008; Dawson *et al.*, 2009; Helmer *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die humane Jak2-Kinase nicht nur im Zytoplasma, sondern ebenfalls im Nukleus hämatopoietischer Zellen lokalisiert ist und dort direkt das Y41 des Histons H3 phosphoryliert (Dawson *et al.*, 2009). So könnte Ebf1 durch Jak-Kinasen entweder direkt

während oder nach der Translation im Zytosoma oder erst im Nukleus phosphoryliert werden (Abbildung 4.2) und so in Abhängigkeit IL-7-vermittelter Signalübertragung in seiner Funktion reguliert werden.

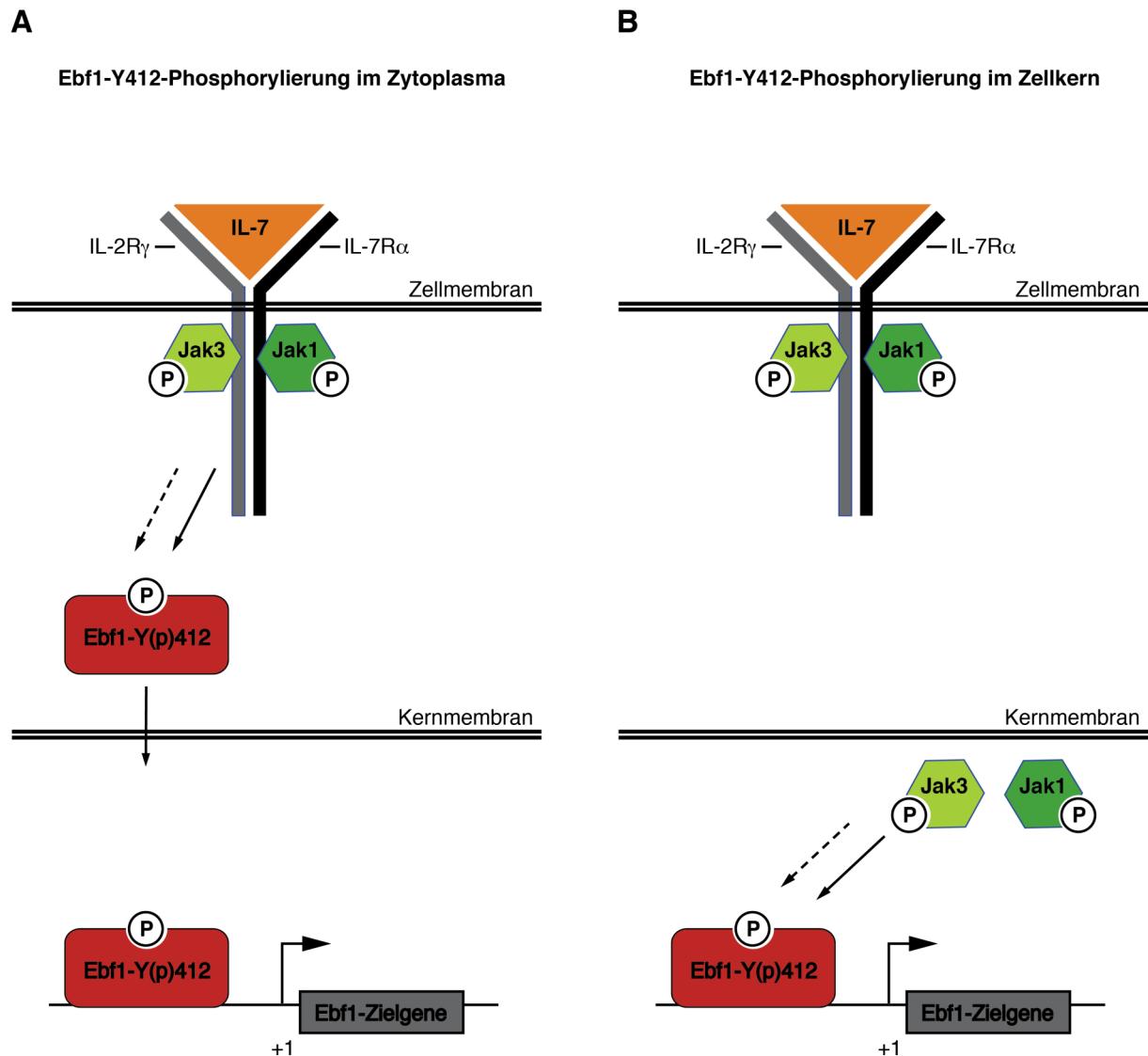


Abbildung 4.2: Mögliches Modell zur potentiellen Phosphorylierung von Ebf1-Y412 durch Jak-Kinasen infolge der IL-7-vermittelten Signalübertragung

A + B: In Abhängigkeit IL-7-vermittelter Signalübertragung könnten Jak-Kinasen entweder direkt (Pfeil) oder indirekt (gestrichelter Pfeil) die Ebf1-Y412-Phosphorylierung im Zytosoma (A) oder alternativ im Zellkern (B) katalysieren.

4.1.5 Die Relevanz der Ebf1-Y412-Phosphorylierung für die Ebf1-induzierte Zielgen-Expression

In welchem Ausmaß die Phosphorylierung von Ebf1-Y412 die zentrale Funktion von Ebf1 in dem komplexen Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren beeinflusst, welches die frühe B-Zell-Differenzierung reguliert, ist bisher noch nicht ausreichend charakterisiert. So wurden von Treiber *et al.* (2010b) kürzlich insgesamt 565 Gene identifiziert, die *in vivo* durch Ebf1 aktiviert, reprimiert oder in ihrer Chromatinstruktur moduliert werden.

Um jedoch erste Hinweise auf den Mechanismus zu erhalten, der in dem beobachteten Defekt in der B-Zell-Differenzierung *Ebf1*-Y412F-transduzierter hämatopoietischer Zellen resultiert, wurden in dieser Arbeit ebenfalls biochemische Funktionen des mutierten Transkriptionsfaktors analysiert. Die Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstelle ist am Ende der dritten Helix der konservierten HLH-Domäne lokalisiert (Abbildung 1.7D; Hagman & Lukin, 2005), welche die Dimerisierung der Ebf1-Proteine und somit deren DNA-Bindung vermittelt. Gelretardierungsexperimente zeigten jedoch eine dem wt-Ebf1 vergleichbare Bindeaktivität von Ebf1-Y412F an die *Ebf1*-Bindestelle des *Mb-1*-Promotors (Abbildung 3.12), sodass zumindest in diesem experimentellen System die DNA-Bindung nicht durch den Ebf1-Y412-Phosphorylierungsstatus beeinflusst wurde. Dennoch könnte die Bindung von Ebf1 an endogenes Chromatin von Ebf1-Zielgenen in B-Zellen durch die Ebf1-Y412-Phosphorylierung moduliert werden. Um die Bindung an bekannte Ebf1-Zielgene *in vivo* zu untersuchen, sollen daher in zukünftigen Versuchen Chromatin-Immunpräzipitationen von ektopisch in B-Zelllinien exprimiertem *Ebf1*-Y412F-Flag unter Verwendung des anti-Flag-Antikörpers durchgeführt werden. Zur Analyse sämtlicher Bindestellen von Ebf1-Y412F könnten des Weiteren, ähnlich wie von Treiber *et al.* (2010b) beschrieben, Genom-weite „*ChIP-on-Chip*“-Analysen dieser Zellen durchgeführt werden und mit *Ebf1*-transfizierten Zellen sowie den veröffentlichten Daten (Treiber *et al.*, 2010b) verglichen werden. Da bisherige Ergebnisse darauf hindeuten, dass nur eine Fraktion des Ebf1 in den verwendeten B-Zelllinien phosphoryliert ist, wäre es des Weiteren interessant, die „*ChIP-on-Chip*“-Analyse ebenfalls mit Zellen durchzuführen, welche die aktivierende Mutante Ebf1-Y412D-Flag exprimieren.

Denkbar wäre auch, dass die HLH-Domäne nicht nur die Dimerisierung von Ebf-Proteinen, sondern auch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt und so, womöglich beeinflusst durch die Ebf1-Y412-Phosphorylierung, die Expression von Zielgenen steuert. Obwohl Ebf1 seit 1991 weitreichend charakterisiert wurde, konnten bisher jedoch

keine interagierenden Proteine von Ebf1 in der B-Zell-Differenzierung identifiziert werden. Es wäre jedoch auch möglich, dass die Ebf1-Y412-Phosphorylierung nicht die Dimerisierung bzw. Interaktion mit anderen Proteinen, sondern, bedingt durch deren Lokalisation am Ende der dritten Helix, die nachfolgende Transaktivierungsdomäne beeinflusst. Es ist bekannt, dass Phosphorylierungsstellen häufig in Gelenkstrukturen von Proteinen lokalisiert sind (Dunker *et al.*, 2002; Iakoucheva *et al.*, 2004; Gnad *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2007). Obwohl über die Kristallstruktur der Transaktivierungsdomäne bisher nichts bekannt ist, wäre es denkbar, dass die Ebf1-Y412-Phosphorylierung die Orientierung dieser Domäne relativ zur HLH-Domäne und somit deren Funktion beeinflusst. So deuten bisherige im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Experimente auf ein reduziertes Transaktivierungspotential des Ebf1-Y412F hin. Mittels Luziferase-Reporter-Assays konnte gezeigt werden, dass Modifikationen der Aminosäure Y412 die Transaktivierung des *Lambda5*-Promotors beeinflussen (Abbildung 3.13). Wie bereits von Sigvardsson *et al.* (1997) beschrieben, führte die Transfektion von Ba/F3-Zellen mit *Ebf1* zu einer Aktivierung des *Lambda5*-Promotors. Demgegenüber war das Transaktivierungspotential von Ebf1-Y412F durchschnittlich um etwa 28 % reduziert. Interessanterweise bewirkte die Expression der aktivierenden Mutante Ebf1-Y412D, die eine Phosphorylierung des Y412 imitiert, wiederum eine dem wt-Ebf1 entsprechende Transaktivierung, was einen weiteren Hinweis auf die funktionelle Relevanz der Ebf1-Y412-Phosphorylierung liefert. Hingegen wurde die von Sigvardsson *et al.* (1997) in Ba/F3-Zellen beschriebene gesteigerte Aktivierung des *Lambda5*-Promotors durch Ebf1 in Kombination mit E2A durch Modifikationen der Aminosäure Y412 nicht signifikant beeinflusst, was darauf hindeutet, dass Ebf1-Y412F synergistisch mit E2A die Transaktivierung von *Lambda5* vermitteln kann. In der Literatur beschrieben ist des Weiteren die Aktivierung der B-Zell-spezifischen Gene *Pax5*, *VpreB* und *Mb-1* durch Ebf1 und E2A (Sigvardsson *et al.*, 1997; O’Riordan & Grosschedl, 1999; Roessler *et al.*, 2007). Daher soll zukünftig auch das Potential von Ebf1-Y412F und E2A zur synergistischen Aktivierung dieser Gene untersucht werden.

Des Weiteren zeigte eine erste Analyse der Ebf1-Y412F-induzierten Expression von Ebf1-Zielgenen in Ba/F3-Zellen eine im Vergleich zu wt-Ebf1 um 17 % bzw. 30 % reduzierte Transaktivierung der Gene *VpreB* und *Mb-1* (Abbildung 3.14). Diese kodieren für Komponenten des Prä-BCRs und sind somit von essentieller Bedeutung für die B-Zell-Differenzierung (s. S. 12 ff.).

Zusammenfassend deuten bisherige Ergebnisse darauf hin, dass das Potential von Ebf1-Y412F zur Transaktivierung verschiedener Ebf1-Zielgene reduziert ist. Hierbei wäre es

denkbar, dass selbst eine um bis zu 30 % reduzierte Zielgen-Expression den beobachteten Defekt in der B-Zell-Differenzierung *Ebf1*-Y412F-transduzierter Zellen verursacht, besonders falls mehrere Zielgene betroffen sind oder diese Gen-Dosis-abhängige Effekte zeigen. Daher soll dieses Resultat in zukünftigen Versuchen weiter bestätigt und zudem weitere bekannte und für die B-Zell-Differenzierung essentielle *Ebf1*-Zielgene wie *Pax5*, *B29*, *Rag-1*, *Rag-2* oder *CD19* analysiert werden. Hierbei ist die *Ebf1*-Y412F-induzierte Expression von *Pax5* von besonderem Interesse, da *Pax5* essentielle B-Zell-spezifische Gene wie *Mb-1*, *CD19* und *Blnk* aktiviert und den kontinuierlichen Erhalt der B-Zell-Identität gewährleistet (Nutt *et al.*, 1999 & 2001; Cobaleda *et al.*, 2007). Zusätzlich zu diesen *Ebf1*-Zielgen-Studien in der murinen B-Zelllinie Ba/F3 ist es geplant, *Ebf1*-Y412F-transduzierte Zellen aus dem Knochenmark rekonstituierter Mäuse zu sortieren und mittels quantitativer Realtime-PCR bezüglich der Expression der oben genannten *Ebf1*-Zielgene zu analysieren. Alternativ könnten *Ebf1*-defiziente Prä-Pro-B-Zellen (Fraktion A) auch, ähnlich wie bereits beschrieben (Pongubala *et al.*, 2008; Treiber *et al.*, 2010b), retroviral mit *Ebf1*-Y412F transduziert werden und die Expression bekannter *Ebf1*-Zielgene bereits nach 24 h mittels quantitativer Realtime-PCR analysiert oder ein DNA-Micro-Array dieser Zellen durchgeführt werden.

Anhand des *Mb-1*-Promotors sollen in zukünftigen Versuchen erste Aussagen über die gleichzeitige Fähigkeit von *Ebf1*-Y412F zur DNA-Bindung, Chromatin-Modulation, und synergistischen Transaktivierung mit *Runx1* gewonnen werden. Hierzu soll die Zelllinie μ M.2 verwendet werden, die sich von der Plasmazytom-Zelllinie 558L μ M ableitet und in Folge einer Hypermethylation des *Mb-1*-Promotors kein IgM auf der Zelloberfläche exprimiert (Hombach *et al.*, 1988a & 1988b; Maier *et al.*, 2003). Maier *et al.* (2004) konnten bereits zeigen, dass *Ebf1* eine Demethylierung und einen nukleosomalen Umbau des *Mb-1*-Promotors in μ M.2-Zellen vermittelt und zusammen mit dem Transkriptionsfaktor *Runx1* die *Mb-1*-Transkription aktiviert, wodurch IgM auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Daher würde es eine ektopische Expression von *Ebf1*-Y412F in diesen Zellen erlauben, das Potential des mutierten Transkriptionsfaktors zur Demethylierung des *Mb-1*-Promotors, gemessen durch Natriumbisulfat-Behandlung der DNA mit anschließender DNA-Sequenzierung, zu untersuchen. Mittels durchflusszytometrischer Analyse der IgM-Oberflächenexpression nach einer Koexpression von *Ebf1*-Y412F und *Runx1* hingegen soll das Potential von *Ebf1*-Y412F zur synergistischen Transaktivierung des *Mb-1*-Promotors analysiert werden.

Zusammenfassend können nur durch zukünftige Analysen zahlreicher weiterer *Ebf1*-Zielgene Hinweise darauf gewonnen werden, inwieweit die Phosphorylierung von *Ebf1*-Y412 die

Funktionen von *Ebf1* zur Aktivierung, Repression und Chromatin-Modulation der bisher identifizierten 565 Gene beeinflusst.

4.2 Untersuchungen zur Redundanz von Ebf-Proteinen

4.2.1 Stellt die B-Zell-Differenzierung ein geeignetes System für Analysen potentiell redundanter Wirkungsweisen der Ebf-Proteine dar?

Unter dem Begriff Redundanz versteht man das zusätzliche, möglicherweise überflüssige Vorhandensein funktionell gleicher Ressourcen. Eine potentielle Redundanz der Ebf-Proteine ist seit mehreren Jahren Gegenstand kontroverser Diskussionen. So werden für die Proteine der Ebf-Familie sowohl redundante als auch spezifische Funktionen vermutet (s. S. 34).

Die Ebf-Proteine *Ebf1-4* aus *M. musculus* zeigen mit einer Übereinstimmung der Proteinsequenz von mehr als 75 % untereinander einen hohen Homologiegrad und sind in vielen murinen Geweben simultan und überlappend exprimiert (s. S. 34 ff). Die hohe Homologie und überlappende Expressionsmuster sowie die Tatsache, dass die Ebf-Proteine in Form von Homo- oder Heterodimeren an dieselbe DNA-Sequenz binden (Hagman *et al.*, 1993 & 1995; Travis *et al.*, 1993; Wang & Reed, 1993; Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Treiber *et al.*, 2010a), lassen eine redundante Funktion vermuten. Analysen potentiell redundanter Wirkungsweisen werden in vielen Geweben jedoch durch die simultane und überlappende Expression der Ebf-Proteine erschwert. So kann beispielsweise im Gehirn und olfaktorischen Epithel *Ebf1*-defizienter Mäuse, in denen alle vier Ebf-Proteine koexprimiert sind, keine abnormale Entwicklung beobachtet werden (Lin & Grosschedl, 1995). In B-Zellen hingegen ist *Ebf1* als einziges Mitglied der Ebf-Familie exprimiert und durch eine ektopische *Ebf1*-Expression in *Ebf1*-defizienten hämatopoietischen Vorläufern kann die in diesen Zellen arretierte B-Zell-Differenzierung wiederhergestellt werden (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10; Pongubala *et al.*, 2008). Daher eignet sich dieses experimentelle System, um potentiell redundante Wirkungsweisen der murinen Ebf-Proteine anhand der B-Zell-Differenzierung zu untersuchen.

4.2.2 *Ebf2-*, *Ebf3-* und *Ebf4*-transduzierte fötale Leberzellen zeigen einen Defekt in der *in vitro*-B-Zell-Differenzierung

Um zu untersuchen, ob die anderen Ebf-Proteine die essentielle Funktion von Ebf1 in der frühen B-Zell-Differenzierung übernehmen können, wurde das Potential *Ebf2*-, *Ebf3*- oder *Ebf4*-transduzierter fötaler Leberzellen aus *Ebf1*-defizienten Mäusen zur *in vitro*-B-Zell-Differenzierung analysiert. Durch Analyse der *CD19*-Expression konnte gezeigt werden, dass keines der Ebf-Proteine in der Lage war, die arretierte B-Zell-Differenzierung dieser Zellen wiederherzustellen (Abbildung 3.21). So führte eine ektopische Expression von *Ebf2*, *Ebf3* oder *Ebf4* nicht zu einem erhöhten Anteil CD19-positiver Zellen (durchschnittlich zwischen etwa 6,8-7,6 % CD19-positive Zellen) gegenüber *mock*-transduzierten Zellen (durchschnittlich etwa 8 % CD19-positive Zellen).

Somit konnte anhand dieses experimentellen Systems gezeigt werden, dass weder *Ebf2*, *Ebf3* noch *Ebf4* die Funktion von *Ebf1* in der B-Zell-Differenzierung ersetzen können. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass die Ebf-Proteine nicht generell in ihrer Wirkungsweise redundant sind, sondern vermutlich Gewebe- bzw. Zelltyp-abhängig redundante oder spezifische Funktionen ausüben können. So wird vermutet, dass *Ebf2* und *Ebf4* die evolutionär ältesten Ebf-Proteine sind, da diese die höchste Verwandtschaft zu den Invertebraten-Ebf-Proteinen Collier und Unc zeigen, und dass *Ebf1* und *Ebf3* durch Gen-Duplikationen von *Ebf2* und *Ebf4* entstanden sind (Liberg *et al.*, 2002). Daher wäre es denkbar, dass die Funktion von *Ebf1* in der B-Zell-Differenzierung durch eine evolutionär spätere Anpassung speziell an B-Zellen entstanden ist und dass daher weder *Ebf2*, *Ebf3* noch *Ebf4* diese Funktion übernehmen können.

Um den Defekt in der *in vitro* B-Zell-Differenzierung weitergehend zu bestätigen, soll in zukünftigen Versuchen ebenfalls das Potential der mit *Ebf2*, *Ebf3* oder *Ebf4* transduzierten Zellen zur *in vivo*-B-Zell-Differenzierung nach einer Transplantation in letal bestrahlte Mäuse untersucht werden. Zudem soll anhand der *B220*-Expression in diesen Zellen analysiert werden, ob die Ebf-Proteine zumindest partiell die B-Zell-Differenzierung in der Hardy-B-Zell-Fraktion A wiederherstellen.

Die Ursachen für den Defekt in der B-Zell-Differenzierung in den mit *Ebf2*, *Ebf3* oder *Ebf4* transduzierten Zellen sind bisher noch nicht bekannt. Da die B-Zell-Differenzierung durch ein komplexes Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert wird, könnten selbst geringfügige Unterschiede in funktionellen Domänen die Dimerisierung, Protein-Protein-Interaktionen noch unbekannter Art und/oder die DNA-Bindung und somit die Expression

essentieller B-Zell-spezifischer Gene beeinflussen. So ist bisher lediglich für Ebf1, nicht jedoch für die anderen Ebf-Proteine, die Kristallstruktur bekannt (Treiber *et al.*, 2010a). Die DNA-Bindedomäne, die zusammen mit dem darin lokalisierten Zink-Finger-Motiv die Bindung an DNA vermittelt, ist mit bis zu 98 % identischer Proteinsequenz innerhalb der murinen Ebf-Proteine hoch konserviert (Hagman *et al.*, 1993 & 1995; Schwabe & Klug, 1994; Treiber *et al.*, 2010a). Für Ebf1-4 konnte bereits gezeigt werden, dass diese *in vitro* in Form von Homo- und Heterodimeren an dieselbe DNA-Sequenz, einer Variation der palindromischen Sequenz 5'-ATTCCCNNGGAAT-3', binden (Hagman *et al.*, 1993 & 1995; Travis *et al.*, 1993; Wang & Reed, 1993; Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Treiber *et al.*, 2010a). Des Weiteren konnte eine Bindung aller murinen Ebf-Proteine an die Nukleotidsequenz 5'-CAAGGGAAT-3' im *Mb-1*-Promotor beobachtet werden (persönliche Kommunikation Bettina Groll, HMGU München). Die ausgeprägte Homologie in der DNA-Bindedomäne sowie die Bindung aller Ebf-Proteine an dieselbe DNA-Sequenz deuten darauf hin, dass der oben beschriebene Defekt in der B-Zell-Differenzierung in mit *Ebf2*, *Ebf3* oder *Ebf4* transduzierten hämatopoietischen Zellen aus *Ebf1*-defizienten Embryonen vermutlich nicht auf Unterschiede in der DNA-Bindeaktivität der Ebf-Proteine zurückzuführen ist. Ob die DNA-Bindung der Ebf-Proteine jedoch auch an endogenes Chromatin von *Ebf1*-Zielgenen in B-Zellen erfolgt, könnte, wie für *Ebf1-Y412F* beschrieben (s. S. 125 ff.), durch Chromatin-Immunpräzipitationen untersucht werden.

Zur Identifizierung funktionell relevanter Bereiche des Ebf1 für die B-Zell-Differenzierung wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits Konstrukte für verschiedene Ebf1/Ebf3-Fusionsproteine generiert, deren Potential zur *in vitro*- und *in vivo*-B-Zell-Differenzierung in *Ebf1*-defizienten Zellen zukünftig analysiert werden soll. Da Ebf1 und Ebf3 innerhalb der murinen Ebf-Proteine die größte Übereinstimmung in der Proteinsequenz aufweisen (Dubois & Vincent, 2001), Ebf3 im Gegensatz zu Ebf1 jedoch nicht die B-Zell-Differenzierung in *Ebf1*-defizienten Zellen wiederherstellt, wurden die Konstrukte dabei so hergestellt, dass immer größere C-terminal gelegene Bereiche des Ebf3 durch die entsprechenden Bereiche des Ebf1 substituiert werden (Abbildung 4.3).

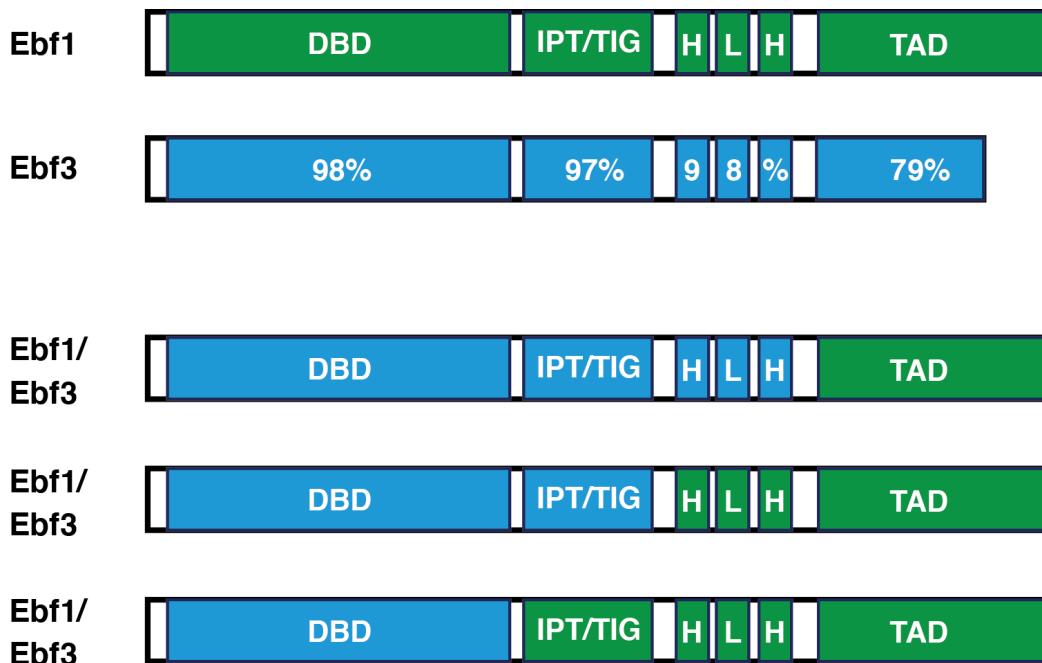


Abbildung 4.3: Generierung von Konstrukten für verschiedene Ebf1/Ebf3-Fusionsproteine

Zur Generierung der Konstrukte wurden immer größere C-terminale Bereiche des Ebf3 (blau) durch die entsprechenden Bereiche des Ebf1 (grün) ersetzt. Angegebene Prozentzahlen geben die Übereinstimmung in der Proteinsequenz der jeweiligen Domäne des Ebf3 in Relation zu Ebf1 an (in Anlehnung an Dubois & Vincent, 2001; Liao, 2009; Hiechinger, 2010; persönliche Kommunikation Bettina Groll, HMGU München). DBD: DNA-Bindedomäne; IPT/TIG: Immunoglobulin-like, plexins, transcription factors/transcription factor immunoglobulin; HLH: Helix Loop Helix; TAD: Transaktivierungsdomäne.

Die C-terminal gelegene Transaktivierungsdomäne, welche die Transaktivierung von Ebf-Zielgenen vermittelt, ist mit bis zu 79 % identischer Proteinsequenz die unter den Ebf-Proteinen am wenigsten konservierte Domäne (Hagman *et al.*, 1995). Wang *et al.* (2002) beschrieben für Ebf4 im Luciferase-Reporter-Assay im Gegensatz zu den Proteinen Ebf1-3 nur ein schwaches Transaktivierungspotential, was durch die vergleichsweise geringe Homologie der Transaktivierungsdomäne begründet sein könnte. Um erste Hinweise auf die Ursachen der defekten B-Zell-Differenzierung in mit *Ebf2*, *Ebf3* oder *Ebf4* transduzierten *Ebf1*-defizienten Zellen zu erhalten, wurde daher im Rahmen dieser Arbeit die Fähigkeit der Proteine Ebf1-4 zur Transaktivierung B-Zell-spezifischer Gene analysiert. In dem hier durchgeführten Luciferase-Reporter-Assay konnte eine vergleichbare Induktion des *Lambda5*-Promotors durch Ebf1-4 gezeigt werden (Abbildung 3.22). Hingegen des von Wang *et al.* (2002) für Ebf4 beschriebenen reduzierten Transaktivierungspotentials bewirkte Ebf4 in diesem experimentellen System im Vergleich zu Ebf1-3 keine verminderte Induktion des *Lambda5*-Promotors. Der von Wang *et al.* (2002) durchgeführte Luciferase-Reporter-Assay wurde jedoch in HEK293T-Zellen mit Hilfe eines Reporter-Plasmids durchgeführt, welches

10 konkatemerisierte Ebf-Bindestellen enthält und Ebf-abhängig das *Luziferase*-Reporterogen unter Kontrolle des nativen *SV40*-Promotors exprimiert (Wang *et al.*, 1997 & 2002). Das Transaktivierungspotential von Ebf4 könnte demnach Promotor-abhängig bzw. gewebsspezifisch sein.

Zur Analyse des Potentials der Ebf-Proteine zur Transaktivierung endogener B-Zell-spezifischer Gene wurde in der murinen Pro-B-Zelllinie Ba/F3 die Ebf1-4-induzierte Expression von *VpreB* und *Mb-1* analysiert (Abbildung 3.23). Eine erste Analyse deutete hierbei bei vergleichbarer *Ebf*-Expression auf eine differentielle Induktion dieser Gene durch Ebf1-4 hin. Zwar bewirkten alle vier Ebf-Proteine gegenüber *mock*-transfizierten Zellen eine Transaktivierung von *VpreB* und *Mb-1*, deren Induktion durch die verschiedenen Ebf-Proteine divergierte allerdings zwischen 5- bis 42-fach. Hierbei zeigten Ebf1 und Ebf2 ein vergleichbares Transaktivierungspotential, wobei Ebf2 gegenüber Ebf1 sogar eine leicht erhöhte Induktion der beiden Gene bewirkte, während demgegenüber das Transaktivierungspotential von Ebf3 und Ebf4 um bis zu 85 % reduziert war. Diese potentiell unterschiedliche Fähigkeit der Ebf-Proteine zur Transaktivierung B-Zell-spezifischer Gene könnte eine mögliche Ursache für den beobachteten Defekt in der B-Zell-Differenzierung in den mit *Ebf3* oder *Ebf4* transduzierten *Ebf1*-defizienten Zellen sein und soll daher in zukünftigen Versuchen weitergehend bestätigt werden. Des Weiteren soll die Transaktivierung weiterer bekannter und für die B-Zell-Differenzierung essentieller Ebf1-Zielgene wie *Pax5*, *B29*, *Rag-1*, *Rag-2* oder *CD19* durch Ebf2-4 und zudem das Potential der oben beschriebenen Ebf1/Ebf3-Fusionsproteine zur Aktivierung dieser Gene analysiert werden.

Interessant wäre es des Weiteren zu untersuchen, ob die anderen Ebf-Proteine in B-Zellen ebenfalls eine dem Ebf1-Y412 entsprechende Tyrosin-Phosphorylierung zeigen. Obwohl dieses Tyrosin in allen murinen Ebf-Proteinen konserviert ist, zeigen zumindest Ebf2 und Ebf4 Abweichungen in den umgebenden Peptidsequenzen (Abbildung 3.3). Durch solche Abweichungen im Akzeptor-Motiv oder potentiell unterschiedliche native Strukturen der Ebf-Proteine könnte die Interaktion mit Protein-Kinasen und so die für die B-Zell-Differenzierung relevante Y412-Phosphorylierung beeinflusst werden. Um eine Y412-Phosphorylierung der Ebf-Proteine und deren potentielle Relevanz für die B-Zell-Differenzierung zu analysieren, könnten daher zukünftig massenspektrometrische Analysen der Ebf-Proteine erfolgen oder alternativ die Fähigkeit aktivierender Mutanten (Ebf2-, Ebf3- und Ebf4-Y412D) zur *in vitro*- und *in vivo*-B-Zell-Differenzierung sowie Aktivierung B-Zell-spezifischer Gene getestet werden.

Referenzen

- Adolfsson, J., R. Mansson, N. Buza-Vidas, A. Hultquist, K. Liuba, C.T. Jensen, D. Bryder, L. Yang, O.J. Borge, L.A. Thoren, K. Anderson, E. Sitnicka, Y. Sasaki, M. Sigvardsson, and S.E. Jacobsen. 2005. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell.* 121:295-306.
- Akashi, K., and I.L. Weissman. 2001. Stem cells and hematolymphoid development. In *Hematopoiesis: A Developmental Approach*, L.I. Zon, ed. (Oxford, UK: Oxford University Press):pp.15-34.
- Akerblad, P., U. Lind, D. Liberg, K. Bamberg, and M. Sigvardsson. 2002. Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Molecular and cellular biology.* 22:8015-8025.
- Akerblad, P., M. Rosberg, T. Leanderson, and M. Sigvardsson. 1999. The B29 (immunoglobulin beta-chain) gene is a genetic target for early B-cell factor. *Molecular and cellular biology.* 19:392-401.
- Allman, D., R.C. Lindsley, W. DeMuth, K. Rudd, S.A. Shinton, and R.R. Hardy. 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *Journal of immunology.* 167:6834-6840.
- Allman, D., B. Srivastava, and R.C. Lindsley. 2004. Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. *Immunological reviews.* 197:147-160.
- Allman, D.M., S.E. Ferguson, and M.P. Cancro. 1992. Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. *Journal of immunology.* 149:2533-2540.
- Allman, D.M., S.E. Ferguson, V.M. Lentz, and M.P. Cancro. 1993. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *Journal of immunology.* 151:4431-4444.
- Alt, F.W., T.K. Blackwell, R.A. DePinho, M.G. Reth, and G.D. Yancopoulos. 1986. Regulation of genome rearrangement events during lymphocyte differentiation. *Immunological reviews.* 89:5-30.

- Alt, F.W., T.K. Blackwell, and G.D. Yancopoulos. 1987. Development of the primary antibody repertoire. *Science*. 238:1079-1087.
- Aravind, L., and E.V. Koonin. 1999. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *Journal of molecular biology*. 287:1023-1040.
- Bain, G., E.C. Maandag, D.J. Izon, D. Amsen, A.M. Kruisbeek, B.C. Weintraub, I. Krop, M.S. Schlissel, A.J. Feeney, M. van Roon, and et al. 1994. E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell*. 79:885-892.
- Barker, J.E., M.A. Keenan, and L. Raphals. 1969. Development of the mouse hematopoietic system. II. Estimation of spleen and liver "stem" cell number. *Journal of cellular physiology*. 74:51-56.
- Bassing, C.H., W. Swat, and F.W. Alt. 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*. 109 Suppl:S45-55.
- Beausoleil, S.A., M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villen, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley, and S.P. Gygi. 2004. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:12130-12135.
- Beck, K., M.M. Peak, T. Ota, D. Nemazee, and C. Murre. 2009. Distinct roles for E12 and E47 in B cell specification and the sequential rearrangement of immunoglobulin light chain loci. *The Journal of experimental medicine*. 206:2271-2284.
- Bennett, K.L., M. Karpenko, M.T. Lin, R. Claus, K. Arab, G. Dyckhoff, P. Plinkert, E. Herpel, D. Smiraglia, and C. Plass. 2008. Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 68:4494-4499.
- Blom, N., T. Sicheritz-Ponten, R. Gupta, S. Gammeltoft, and S. Brunak. 2004. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 4:1633-1649.
- Bodenmiller, B., J. Malmstrom, B. Gerrits, D. Campbell, H. Lam, A. Schmidt, O. Rinner, L.N. Mueller, P.T. Shannon, P.G. Pedrioli, C. Panse, H.K. Lee, R. Schlapbach, and R. Aebersold. 2007. PhosphoPep--a phosphoproteome resource for systems biology research in *Drosophila* Kc167 cells. *Molecular systems biology*. 3:139.
- Bork, P., T. Doerks, T.A. Springer, and B. Snel. 1999. Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends in biochemical sciences*. 24:261-263.

- Bossy, D., M. Milili, J. Zucman, G. Thomas, M. Fougereau, and C. Schiff. 1991. Organization and expression of the lambda-like genes that contribute to the mu-psi light chain complex in human pre-B cells. *International immunology*. 3:1081-1090.
- Boussiotis, V.A., D.L. Barber, T. Nakarai, G.J. Freeman, J.G. Gribben, G.M. Bernstein, A.D. D'Andrea, J. Ritz, and L.M. Nadler. 1994. Prevention of T cell anergy by signaling through the gamma c chain of the IL-2 receptor. *Science*. 266:1039-1042.
- Brouns, G.S., E. de Vries, C.J. van Noesel, D.Y. Mason, R.A. van Lier, and J. Borst. 1993. The structure of the mu/pseudo light chain complex on human pre-B cells is consistent with a function in signal transduction. *European journal of immunology*. 23:1088-1097.
- Cancro, M.P., A.P. Sah, S.L. Levy, D.M. Allman, M.R. Schmidt, and R.T. Woodland. 2001. xid mice reveal the interplay of homeostasis and Bruton's tyrosine kinase-mediated selection at multiple stages of B cell development. *International immunology*. 13:1501-1514.
- Capel, B., R. Hawley, L. Covarrubias, T. Hawley, and B. Mintz. 1989. Clonal contributions of small numbers of retrovirally marked hematopoietic stem cells engrafted in unirradiated neonatal W/Wv mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:4564-4568.
- Chen, J., A. Ma, F. Young, and F.W. Alt. 1994. IL-2 receptor alpha chain expression during early B lymphocyte differentiation. *International immunology*. 6:1265-1268.
- Chen, X., S.T. Cheung, S. So, S.T. Fan, C. Barry, J. Higgins, K.M. Lai, J. Ji, S. Dudoit, I.O. Ng, M. Van De Rijn, D. Botstein, and P.O. Brown. 2002. Gene expression patterns in human liver cancers. *Molecular biology of the cell*. 13:1929-1939.
- Christensen, J.L., and I.L. Weissman. 2001. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:14541-14546.
- Cobaleda, C., A. Schebesta, A. Delogu, and M. Busslinger. 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature immunology*. 8:463-470.
- Coffman, R.L. 1982. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunological reviews*. 69:5-23.
- Cohen, P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends in biochemical sciences*. 25:596-601.

- Corradi, A., L. Croci, V. Broccoli, S. Zecchini, S. Previtali, W. Wurst, S. Amadio, R. Maggi, A. Quattrini, and G.G. Consalez. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development*. 130:401-410.
- Crozier, M., J.M. Ubeda, A. Vincent, and M. Meister. 2004. Cellular immune response to parasitization in Drosophila requires the EBF orthologue collier. *PLoS biology*. 2:E196.
- Crozier, M., D. Valle, L. Dubois, S. Ibnsouda, and A. Vincent. 1996. Collier, a novel regulator of Drosophila head development, is expressed in a single mitotic domain. *Current biology : CB*. 6:707-718.
- Cumano, A., F. Dieterlen-Lievre, and I. Godin. 1996. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. *Cell*. 86:907-916.
- Cumano, A., C.J. Paige, N.N. Iscove, and G. Brady. 1992. Bipotential precursors of B cells and macrophages in murine fetal liver. *Nature*. 356:612-615.
- Daburon, V., S. Mella, J.L. Plouhinec, S. Mazan, M. Crozatier, and A. Vincent. 2008. The metazoan history of the COE transcription factors. Selection of a variant HLH motif by mandatory inclusion of a duplicated exon in vertebrates. *BMC evolutionary biology*. 8:131.
- Darnell, J.E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science*. 277:1630-1635.
- Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 264:1415-1421.
- Dawson, M.A., A.J. Bannister, B. Gottgens, S.D. Foster, T. Bartke, A.R. Green, and T. Kouzarides. 2009. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 461:819-822.
- de Bruijn, M.F., N.A. Speck, M.C. Peeters, and E. Dzierzak. 2000. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *The EMBO journal*. 19:2465-2474.
- Decker, T., M. Pasca di Magliano, S. McManus, Q. Sun, C. Bonifer, H. Tagoh, and M. Busslinger. 2009. Stepwise activation of enhancer and promoter regions of the B cell commitment gene Pax5 in early lymphopoiesis. *Immunity*. 30:508-520.
- DeKoter, R.P., H.J. Lee, and H. Singh. 2002. PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity*. 16:297-309.

- DeKoter, R.P., and H. Singh. 2000. Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science*. 288:1439-1441.
- Dias, S., H. Silva, Jr., A. Cumano, and P. Vieira. 2005. Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *The Journal of experimental medicine*. 201:971-979.
- Domen, J., and I.L. Weissman. 1999. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Molecular medicine today*. 5:201-208.
- Dubois, L., and A. Vincent. 2001. The COE--Collier/Olf1/EBF--transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions. *Mechanisms of development*. 108:3-12.
- Dunker, A.K., C.J. Brown, J.D. Lawson, L.M. Iakoucheva, and Z. Obradovic. 2002. Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*. 41:6573-6582.
- Edman, P. 1949. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Archives of biochemistry*. 22:475.
- Ehlich, A., S. Schaal, H. Gu, D. Kitamura, W. Muller, and K. Rajewsky. 1993. Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell*. 72:695-704.
- Ema, H., I. Douagi, A. Cumano, and P. Kourilsky. 1998. Development of T cell precursor activity in the murine fetal liver. *European journal of immunology*. 28:1563-1569.
- Ema, H., and H. Nakauchi. 2000. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood*. 95:2284-2288.
- Fang, W., D.L. Mueller, C.A. Pennell, J.J. Rivard, Y.S. Li, R.R. Hardy, M.S. Schlissel, and T.W. Behrens. 1996. Frequent aberrant immunoglobulin gene rearrangements in pro-B cells revealed by a bcl-xL transgene. *Immunity*. 4:291-299.
- Faust, E.A., D.C. Saffran, D. Toksoz, D.A. Williams, and O.N. Witte. 1993. Distinctive growth requirements and gene expression patterns distinguish progenitor B cells from pre-B cells. *The Journal of experimental medicine*. 177:915-923.
- Feldhaus, A.L., D. Mbangkollo, K.L. Arvin, C.A. Klug, and H. Singh. 1992. BLyF, a novel cell-type- and stage-specific regulator of the B-lymphocyte gene mb-1. *Molecular and cellular biology*. 12:1126-1133.
- Fleischman, R.A., R.P. Custer, and B. Mintz. 1982. Totipotent hematopoietic stem cells: normal self-renewal and differentiation after transplantation between mouse fetuses. *Cell*. 30:351-359.

- Fuxa, M., J. Skok, A. Souabni, G. Salvagiotto, E. Roldan, and M. Busslinger. 2004. Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes & development.* 18:411-422.
- Garavelli, J.S. 2003. The RESID Database of Protein Modifications: 2003 developments. *Nucleic acids research.* 31:499-501.
- Garel, S., M. Garcia-Dominguez, and P. Charnay. 2000. Control of the migratory pathway of facial branchiomotor neurones. *Development.* 127:5297-5307.
- Garel, S., F. Marin, R. Grosschedl, and P. Charnay. 1999. Ebf1 controls early cell differentiation in the embryonic striatum. *Development.* 126:5285-5294.
- Garel, S., F. Marin, M.G. Mattei, C. Vesque, A. Vincent, and P. Charnay. 1997. Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 210:191-205.
- Garel, S., K. Yun, R. Grosschedl, and J.L. Rubenstein. 2002. The early topography of thalamocortical projections is shifted in Ebf1 and Dlx1/2 mutant mice. *Development.* 129:5621-5634.
- Ghia, P., E. ten Boekel, A.G. Rolink, and F. Melchers. 1998. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunology today.* 19:480-485.
- Gnad, F., L.M. de Godoy, J. Cox, N. Neuhauser, S. Ren, J.V. Olsen, and M. Mann. 2009. High-accuracy identification and bioinformatic analysis of in vivo protein phosphorylation sites in yeast. *Proteomics.* 9:4642-4652.
- Gnad, F., F. Forner, D.F. Zielinska, E. Birney, J. Gunawardena, and M. Mann. 2010. Evolutionary constraints of phosphorylation in eukaryotes, prokaryotes, and mitochondria. *Molecular & cellular proteomics : MCP.* 9:2642-2653.
- Gnad, F., S. Ren, J. Cox, J.V. Olsen, B. Macek, M. Oroshi, and M. Mann. 2007. PHOSIDA (phosphorylation site database): management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome biology.* 8:R250.
- Godin, I., and A. Cumano. 2005. Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. *The International journal of developmental biology.* 49:251-257.
- Godin, I., F. Dieterlen-Lievre, and A. Cumano. 1995. Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraaortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 92:773-777.

- Godin, I., J.A. Garcia-Porrero, F. Dieterlen-Lievre, and A. Cumano. 1999. Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *The Journal of experimental medicine.* 190:43-52.
- Goetz, C.A., I.R. Harmon, J.J. O'Neil, M.A. Burchill, and M.A. Farrar. 2004. STAT5 activation underlies IL7 receptor-dependent B cell development. *Journal of immunology.* 172:4770-4778.
- Gong, S., and M.C. Nussenzweig. 1996. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science.* 272:411-414.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology.* 36:59-74.
- Greenlund, A.C., M.O. Morales, B.L. Viviano, H. Yan, J. Krolewski, and R.D. Schreiber. 1995. Stat recruitment by tyrosine-phosphorylated cytokine receptors: an ordered reversible affinity-driven process. *Immunity.* 2:677-687.
- Gunji, Y., T. Sudo, J. Suda, Y. Yamaguchi, H. Nakauchi, S. Nishikawa, N. Yanai, M. Obinata, M. Yanagisawa, Y. Miura, and et al. 1991. Support of early B-cell differentiation in mouse fetal liver by stromal cells and interleukin-7. *Blood.* 77:2612-2617.
- Hagman, J., C. Belanger, A. Travis, C.W. Turck, and R. Grosschedl. 1993. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes & development.* 7:760-773.
- Hagman, J., M.J. Gutch, H. Lin, and R. Grosschedl. 1995. EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *The EMBO journal.* 14:2907-2916.
- Hagman, J., and K. Lukin. 2005. Early B-cell factor 'pioneers' the way for B-cell development. *Trends in immunology.* 26:455-461.
- Hagman, J., A. Travis, and R. Grosschedl. 1991. A novel lineage-specific nuclear factor regulates mb-1 gene transcription at the early stages of B cell differentiation. *The EMBO journal.* 10:3409-3417.
- Hardy, R.R., C.E. Carmack, S.A. Shinton, J.D. Kemp, and K. Hayakawa. 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *The Journal of experimental medicine.* 173:1213-1225.

- Hardy, R.R., and K. Hayakawa. 1991. A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:11550-11554.
- Hardy, R.R., and K. Hayakawa. 2001. B cell development pathways. *Annual review of immunology*. 19:595-621.
- Harrison, D.E., R.K. Zhong, C.T. Jordan, I.R. Lemischka, and C.M. Astle. 1997. Relative to adult marrow, fetal liver repopulates nearly five times more effectively long-term than short-term. *Experimental hematology*. 25:293-297.
- Helmer, R.A., M. Panchoo, J.S. Dertien, S.M. Bhakta, A. Hewetson, and B.S. Chilton. 2010. Prolactin-induced Jak2 phosphorylation of RUSH: a key element in Jak/RUSH signaling. *Molecular and cellular endocrinology*. 325:143-149.
- Henderson, A.J., R. Narayanan, L. Collins, and K. Dorshkind. 1992. Status of kappa L chain gene rearrangements and c-kit and IL-7 receptor expression in stromal cell-dependent pre-B cells. *Journal of immunology*. 149:1973-1979.
- Hesslein, D.G., J.A. Fretz, Y. Xi, T. Nelson, S. Zhou, J.A. Lorenzo, D.G. Schatz, and M.C. Horowitz. 2009. Ebf1-dependent control of the osteoblast and adipocyte lineages. *Bone*. 44:537-546.
- Hesslein, D.G., D.L. Pflugh, D. Chowdhury, A.L. Bothwell, R. Sen, and D.G. Schatz. 2003. Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes & development*. 17:37-42.
- Hesslein, D.G., and D.G. Schatz. 2001. Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Advances in immunology*. 78:169-232.
- Hiechinger, S. 2010. Die Rolle von EBF2 in der haematopoietischen Stammzelllinie. *LMU München*.
- Hombach, J., L. Leclercq, A. Radbruch, K. Rajewsky, and M. Reth. 1988a. A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells. *The EMBO journal*. 7:3451-3456.
- Hombach, J., F. Sablitzky, K. Rajewsky, and M. Reth. 1988b. Transfected plasmacytoma cells do not transport the membrane form of IgM to the cell surface. *The Journal of experimental medicine*. 167:652-657.
- Horowitz, M.C., A.L. Bothwell, D.G. Hesslein, D.L. Pflugh, and D.G. Schatz. 2005. B cells and osteoblast and osteoclast development. *Immunological reviews*. 208:141-153.
- Horvath, C.M., and J.E. Darnell. 1997. The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus. *Current opinion in cell biology*. 9:233-239.

- Huang, H., and R. Auerbach. 1993. Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:10110-10114.
- Hunter, T. 2000. Signaling--2000 and beyond. *Cell*. 100:113-127.
- Iakoucheva, L.M., P. Radivojac, C.J. Brown, T.R. O'Connor, J.G. Sikes, Z. Obradovic, and A.K. Dunker. 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic acids research*. 32:1037-1049.
- Igarashi, H., S.C. Gregory, T. Yokota, N. Sakaguchi, and P.W. Kincade. 2002. Transcription from the RAG1 locus marks the earliest lymphocyte progenitors in bone marrow. *Immunity*. 17:117-130.
- Ihle, J.N., B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, K. Yamamoto, W.E. Thierfelder, B. Kreider, and O. Silvennoinen. 1994. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends in biochemical sciences*. 19:222-227.
- Ikawa, T., H. Kawamoto, L.Y. Wright, and C. Murre. 2004. Long-term cultured E2A-deficient hematopoietic progenitor cells are pluripotent. *Immunity*. 20:349-360.
- Inlay, M.A., D. Bhattacharya, D. Sahoo, T. Serwold, J. Seita, H. Karsunky, S.K. Plevritis, D.L. Dill, and I.L. Weissman. 2009. Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes & development*. 23:2376-2381.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 431:931-945.
- Jensen, O.N. 2004. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology*. 8:33-41.
- Jimenez, M.A., P. Akerblad, M. Sigvardsson, and E.D. Rosen. 2007. Critical role for Ebf1 and Ebf2 in the adipogenic transcriptional cascade. *Molecular and cellular biology*. 27:743-757.
- Jin, K., H. Jiang, Z. Mo, and M. Xiang. 2010. Early B-cell factors are required for specifying multiple retinal cell types and subtypes from postmitotic precursors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:11902-11916.
- Johnston, J.A., M. Kawamura, R.A. Kirken, Y.Q. Chen, T.B. Blake, K. Shibuya, J.R. Ortaldo, D.W. McVicar, and J.J. O'Shea. 1994. Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2. *Nature*. 370:151-153.
- Jordan, C.T., J.P. McKearn, and I.R. Lemischka. 1990. Cellular and developmental properties of fetal hematopoietic stem cells. *Cell*. 61:953-963.

- Karasuyama, H., A. Kudo, and F. Melchers. 1990. The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *The Journal of experimental medicine.* 172:969-972.
- Karsunky, H., M.A. Inlay, T. Serwold, D. Bhattacharya, and I.L. Weissman. 2008. Flk2+ common lymphoid progenitors possess equivalent differentiation potential for the B and T lineages. *Blood.* 111:5562-5570.
- Kee, B.L., and C. Murre. 1998. Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *The Journal of experimental medicine.* 188:699-713.
- Kee, B.L., M.W. Quong, and C. Murre. 2000. E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development. *Immunological reviews.* 175:138-149.
- Kerr, W.G., M.D. Cooper, L. Feng, P.D. Burrows, and L.M. Hendershot. 1989. Mu heavy chains can associate with a pseudo-light chain complex (psi L) in human pre-B cell lines. *International immunology.* 1:355-361.
- Kieslinger, M., S. Folberth, G. Dobreva, T. Dorn, L. Croci, R. Erben, G.G. Consalez, and R. Grosschedl. 2005. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts. *Developmental cell.* 9:757-767.
- Kieslinger, M., S. Hiechinger, G. Dobreva, G.G. Consalez, and R. Grosschedl. 2010. Early B cell factor 2 regulates hematopoietic stem cell homeostasis in a cell-nonautonomous manner. *Cell stem cell.* 7:496-507.
- Kikuchi, K., H. Kasai, A. Watanabe, A.Y. Lai, and M. Kondo. 2008. IL-7 specifies B cell fate at the common lymphoid progenitor to pre-proB transition stage by maintaining early B cell factor expression. *Journal of immunology.* 181:383-392.
- Kikuchi, K., A.Y. Lai, C.L. Hsu, and M. Kondo. 2005. IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *The Journal of experimental medicine.* 201:1197-1203.
- Kitamura, D., A. Kudo, S. Schaal, W. Muller, F. Melchers, and K. Rajewsky. 1992. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell.* 69:823-831.
- Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature.* 350:423-426.
- Klaus, G.G., M. Holman, C. Johnson-Leger, C. Elgueta-Karstegl, and C. Atkins. 1997. A re-evaluation of the effects of X-linked immunodeficiency (xid) mutation on B cell

- differentiation and function in the mouse. *European journal of immunology*. 27:2749-2756.
- Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi. 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. 91:661-672.
- Krishna, R.G., and F. Wold. 1993. Post-translational modification of proteins. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*. 67:265-298.
- Krzemien, J., L. Dubois, R. Makki, M. Meister, A. Vincent, and M. Crozatier. 2007. Control of blood cell homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre. *Nature*. 446:325-328.
- Kudo, A., and F. Melchers. 1987. A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *The EMBO journal*. 6:2267-2272.
- Kudrycki, K., C. Stein-Izsak, C. Behn, M. Grillo, R. Akeson, and F.L. Margolis. 1993. Olf-1-binding site: characterization of an olfactory neuron-specific promoter motif. *Molecular and cellular biology*. 13:3002-3014.
- Kumaravelu, P., L. Hook, A.M. Morrison, J. Ure, S. Zhao, S. Zuyev, J. Ansell, and A. Medvinsky. 2002. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*. 129:4891-4899.
- Kwon, K., C. Hutter, Q. Sun, I. Bilic, C. Cobaleda, S. Malin, and M. Busslinger. 2008. Instructive role of the transcription factor E2A in early B lymphopoiesis and germinal center B cell development. *Immunity*. 28:751-762.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lai, A.Y., and M. Kondo. 2006. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *The Journal of experimental medicine*. 203:1867-1873.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee,

- N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chissoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.
- Lazorchak, A.S., J. Wojciechowski, M. Dai, and Y. Zhuang. 2006. E2A promotes the survival of precursor and mature B lymphocytes. *Journal of immunology*. 177:2495-2504.
- Leonard, W.J., and J.X. Lin. 2000. Cytokine receptor signaling pathways. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 105:877-888.
- Leonard, W.J., and J.J. O'Shea. 1998. Jaks and STATs: biological implications. *Annual review of immunology*. 16:293-322.
- Leonard, W.J., E.W. Shores, and P.E. Love. 1995. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunological reviews*. 148:97-114.
- Li, W.X. 2008. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends in cell biology*. 18:545-551.
- Li, Y.S., K. Hayakawa, and R.R. Hardy. 1993. The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *The Journal of experimental medicine*. 178:951-960.
- Liao, D. 2009. Emerging roles of the EBF family of transcription factors in tumor suppression. *Molecular cancer research*. 7:1893-901
- Liberg, D., M. Sigvardsson, and P. Akerblad. 2002. The EBF/Olf/Collier family of transcription factors: regulators of differentiation in cells originating from all three embryonal germ layers. *Molecular and cellular biology*. 22:8389-8397.
- Lin, H., and R. Grosschedl. 1995. Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature*. 376:263-267.
- Lin, J.X., T.S. Migone, M. Tsang, M. Friedmann, J.A. Weatherbee, L. Zhou, A. Yamauchi, E.T. Bloom, J. Mietz, S. John, and et al. 1995. The role of shared receptor motifs and

- common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity*. 2:331-339.
- Liu, F., X. Zhao, F. Perna, L. Wang, P. Koppikar, O. Abdel-Wahab, M.W. Harr, R.L. Levine, H. Xu, A. Tefferi, A. Deblasio, M. Hatlen, S. Menendez, and S.D. Nimer. 2011. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer cell*. 19:283-294.
- Lobo, M.K., C. Yeh, and X.W. Yang. 2008. Pivotal role of early B-cell factor 1 in development of striatonigral medium spiny neurons in the matrix compartment. *Journal of neuroscience research*. 86:2134-2146.
- Loder, F., B. Mutschler, R.J. Ray, C.J. Paige, P. Sideras, R. Torres, M.C. Lamers, and R. Carsetti. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *The Journal of experimental medicine*. 190:75-89.
- Lu, L., and D.G. Osmond. 1997. Apoptosis during B lymphopoiesis in mouse bone marrow. *Journal of immunology*. 158:5136-5145.
- Macek, B., M. Mann, and J.V. Olsen. 2009. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 49:199-221.
- Mackarehtschian, K., J.D. Hardin, K.A. Moore, S. Boast, S.P. Goff, and I.R. Lemischka. 1995. Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 3:147-161.
- Mahajan, S., S. Ghosh, E.A. Sudbeck, Y. Zheng, S. Downs, M. Hupke, and F.M. Uckun. 1999. Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2, 5-dibromophenyl)propenamide]. *The Journal of biological chemistry*. 274:9587-9599.
- Maier, H., J. Colbert, D. Fitzsimmons, D.R. Clark, and J. Hagman. 2003. Activation of the early B-cell-specific mb-1 (Ig-alpha) gene by Pax-5 is dependent on an unmethylated Ets binding site. *Molecular and cellular biology*. 23:1946-1960.
- Maier, H., R. Ostraat, H. Gao, S. Fields, S.A. Shinton, K.L. Medina, T. Ikawa, C. Murre, H. Singh, R.R. Hardy, and J. Hagman. 2004. Early B cell factor cooperates with Runx1 and mediates epigenetic changes associated with mb-1 transcription. *Nature immunology*. 5:1069-1077.
- Malgaretti, N., O. Pozzoli, A. Bosetti, A. Corradi, S. Ciarmatori, M. Panigada, M.E. Bianchi, S. Martinez, and G.G. Consalez. 1997. Mmot1, a new helix-loop-helix transcription

- factor gene displaying a sharp expression boundary in the embryonic mouse brain. *The Journal of biological chemistry.* 272:17632-17639.
- Mandel, E.M., and R. Grosschedl. 2010. Transcription control of early B cell differentiation. *Current opinion in immunology.* 22:161-167.
- Manning, G., G.D. Plowman, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences.* 27:514-520.
- Mansson, R., A. Hultquist, S. Luc, L. Yang, K. Anderson, S. Kharazi, S. Al-Hashmi, K. Liuba, L. Thoren, J. Adolfsson, N. Buza-Vidas, H. Qian, S. Soneji, T. Enver, M. Sigvardsson, and S.E. Jacobsen. 2007. Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity.* 26:407-419.
- Mansson, R., S. Zandi, K. Anderson, I.L. Martensson, S.E. Jacobsen, D. Bryder, and M. Sigvardsson. 2008. B-lineage commitment prior to surface expression of B220 and CD19 on hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 112:1048-1055.
- Mansson, R., S. Zandi, E. Welinder, P. Tsapogas, N. Sakaguchi, D. Bryder, and M. Sigvardsson. 2010. Single-cell analysis of the common lymphoid progenitor compartment reveals functional and molecular heterogeneity. *Blood.* 115:2601-2609.
- Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank. 1988. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *Journal of virology.* 62:1120-1124.
- Matsuo, T., M. Kimoto, and N. Sakaguchi. 1991. Direct identification of the putative surface IgM receptor-associated molecule encoded by murine B cell-specific mb-1 gene. *Journal of immunology.* 146:1584-1590.
- Medina, K.L., J.M. Pongubala, K.L. Reddy, D.W. Lancki, R. Dekoter, M. Kieslinger, R. Grosschedl, and H. Singh. 2004. Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Developmental cell.* 7:607-617.
- Medvinsky, A., and E. Dzierzak. 1996. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell.* 86:897-906.
- Melchers, F. 1977a. B lymphocyte development in fetal liver. I. Development of reactivities to B cell mitogens "in vivo" and "in vitro". *European journal of immunology.* 7:476-481.
- Melchers, F. 1977b. B lymphocyte development in fetal liver. II. Frequencies of precursor B cells during gestation. *European journal of immunology.* 7:482-486.

- Melchers, F., H. Von Boehmer, and R.A. Phillips. 1975. B-lymphocyte subpopulations in the mouse. Organ distribution and ontogeny of immunoglobulin-synthesizing and of mitogen-sensitive cells. *Transplantation reviews*. 25:26-58.
- Mella, S., C. Soula, D. Morello, M. Crozatier, and A. Vincent. 2004. Expression patterns of the coe/ebf transcription factor genes during chicken and mouse limb development. *Gene expression patterns : GEP*. 4:537-542.
- Metcalf, D., and M.A.S. Moore. 1971. Embryonic aspects of haematopoiesis. In A. Neuberger et E.L. Tatum Eds (ed.), *Haematopoietic cells*. North Holland Publish. Co., Amsterdam, London. 24:173-271.
- Micklem, H.S., C.E. Ford, E.P. Evans, D.A. Ogden, and D.S. Papworth. 1972. Competitive in vivo proliferation of foetal and adult haematopoietic cells in lethally irradiated mice. *Journal of cellular physiology*. 79:293-298.
- Milatovich, A., R.G. Qiu, R. Grosschedl, and U. Francke. 1994. Gene for a tissue-specific transcriptional activator (EBF or Olf-1), expressed in early B lymphocytes, adipocytes, and olfactory neurons, is located on human chromosome 5, band q34, and proximal mouse chromosome 11. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 5:211-215.
- Minegishi, Y., E. Coustan-Smith, L. Rapalus, F. Ersoy, D. Campana, and M.E. Conley. 1999. Mutations in Igalpha (CD79a) result in a complete block in B-cell development. *The Journal of clinical investigation*. 104:1115-1121.
- Miyazaki, T., A. Kawahara, H. Fujii, Y. Nakagawa, Y. Minami, Z.J. Liu, I. Oishi, O. Silvennoinen, B.A. Witthuhn, J.N. Ihle, and et al. 1994. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*. 266:1045-1047.
- Moore, M.A., and D. Metcalf. 1970. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *British journal of haematology*. 18:279-296.
- Morrison, S.J., H.D. Hemmati, A.M. Wandycz, and I.L. Weissman. 1995. The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:10302-10306.
- Morrison, S.J., and I.L. Weissman. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. 1:661-673.
- Mortz, E., P.B. O'Connor, P. Roepstorff, N.L. Kelleher, T.D. Wood, F.W. McLafferty, and M. Mann. 1996. Sequence tag identification of intact proteins by matching tandem mass

- spectral data against sequence data bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93:8264-8267.
- Muller, A.M., A. Medvinsky, J. Strouboulis, F. Grosveld, and E. Dzierzak. 1994. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity.* 1:291-301.
- Mundt, C., S. Licence, T. Shimizu, F. Melchers, and I.L. Martensson. 2001. Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *The Journal of experimental medicine.* 193:435-445.
- Murre, C., G. Bain, M.A. van Dijk, I. Engel, B.A. Furnari, M.E. Massari, J.R. Matthews, M.W. Quong, R.R. Rivera, and M.H. Stuiver. 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochimica et biophysica acta.* 1218:129-135.
- Murre, C., P.S. McCaw, and D. Baltimore. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell.* 56:777-783.
- Murre, C., A. Voronova, and D. Baltimore. 1991. B-cell- and myocyte-specific E2-box-binding factors contain E12/E47-like subunits. *Molecular and cellular biology.* 11:1156-1160.
- Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage, I.M. Verma, and D. Trono. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 272:263-267.
- Nie, L., M. Xu, A. Vladimirova, and X.H. Sun. 2003. Notch-induced E2A ubiquitination and degradation are controlled by MAP kinase activities. *The EMBO journal.* 22:5780-5792.
- Nilsson, J., G. Bjursell, and M. Kannius-Janson. 2006. Nuclear Jak2 and transcription factor NF1-C2: a novel mechanism of prolactin signaling in mammary epithelial cells. *Molecular and cellular biology.* 26:5663-5674.
- Nishimoto, N., H. Kubagawa, T. Ohno, G.L. Gartland, A.K. Stankovic, and M.D. Cooper. 1991. Normal pre-B cells express a receptor complex of mu heavy chains and surrogate light-chain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88:6284-6288.
- Nutt, S.L., D. Eberhard, M. Horcher, A.G. Rolink, and M. Busslinger. 2001. Pax5 determines the identity of B cells from the beginning to the end of B-lymphopoiesis. *International reviews of immunology.* 20:65-82.

- Nutt, S.L., B. Heavey, A.G. Rolink, and M. Busslinger. 1999. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*. 401:556-562.
- Nutt, S.L., and B.L. Kee. 2007. The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity*. 26:715-725.
- Nutt, S.L., P. Urbanek, A. Rolink, and M. Busslinger. 1997. Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes & development*. 11:476-491.
- O'Riordan, M., and R. Grosschedl. 1999. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity*. 11:21-31.
- Oettinger, M.A., D.G. Schatz, C. Gorka, and D. Baltimore. 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*. 248:1517-1523.
- Ogawa, M., S. Nishikawa, K. Ikuta, F. Yamamura, M. Naito, and K. Takahashi. 1988. B cell ontogeny in murine embryo studied by a culture system with the monolayer of a stromal cell clone, ST2: B cell progenitor develops first in the embryonal body rather than in the yolk sac. *The EMBO journal*. 7:1337-1343.
- Ohbo, K., T. Suda, M. Hashiyama, A. Mantani, M. Ikebe, K. Miyakawa, M. Moriyama, M. Nakamura, M. Katsuki, K. Takahashi, K. Yamamura, and K. Sugamura. 1996. Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood*. 87:956-967.
- Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, P. Mortensen, and M. Mann. 2006. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*. 127:635-648.
- Olsen, J.V., M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M.L. Miller, L.J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T.S. Jensen, E.A. Nigg, S. Brunak, and M. Mann. 2010. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling*. 3:ra3.
- Osmond, D.G., N. Kim, R. Manoukian, R.A. Phillips, S.A. Rico-Vargas, and K. Jacobsen. 1992. Dynamics and localization of early B-lymphocyte precursor cells (pro-B cells) in the bone marrow of scid mice. *Blood*. 79:1695-1703.
- Osmond, D.G., S. Priddle, and S. Rico-Vargas. 1990. Proliferation of B cell precursors in bone marrow of pristane-conditioned and malaria-infected mice: implications for B cell oncogenesis. *Current topics in microbiology and immunology*. 166:149-157.

- Osmond, D.G., A. Rolink, and F. Melchers. 1998. Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunology today*. 19:65-68.
- Paige, C.J. 1983. Surface immunoglobulin-negative B-cell precursors detected by formation of antibody-secreting colonies in agar. *Nature*. 302:711-713.
- Paige, C.J., R.H. Gisler, J.P. McKearn, and N.N. Iscove. 1984. Differentiation of murine B cell precursors in agar culture. Frequency, surface marker analysis and requirements for growth of clonable pre-B cells. *European journal of immunology*. 14:979-987.
- Paige, C.J., P.W. Kincade, and P. Ralph. 1978. Murine B cell leukemia line with inducible surface immunoglobulin expression. *Journal of immunology*. 121:641-647.
- Palacios, R., G. Henson, M. Steinmetz, and J.P. McKearn. 1984. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature*. 309:126-131.
- Palacios, R., and M. Steinmetz. 1985. IL-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*. 41:727-734.
- Park, L.S., D.J. Friend, A.E. Schmierer, S.K. Dower, and A.E. Namen. 1990. Murine interleukin 7 (IL-7) receptor. Characterization on an IL-7-dependent cell line. *The Journal of experimental medicine*. 171:1073-1089.
- Pawson, T., and P. Nash. 2000. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes & development*. 14:1027-1047.
- Pawson, T., and J.D. Scott. 2005. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends in biochemical sciences*. 30:286-290.
- Persons, D.A., M.G. Mehaffey, M. Kaleko, A.W. Nienhuis, and E.F. Vanin. 1998. An improved method for generating retroviral producer clones for vectors lacking a selectable marker gene. *Blood cells, molecules & diseases*. 24:167-182.
- Peschon, J.J., P.J. Morrissey, K.H. Grabstein, F.J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B.C. Gliniak, L.S. Park, S.F. Ziegler, D.E. Williams, C.B. Ware, J.D. Meyer, and B.L. Davison. 1994. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. 180:1955-1960.
- Pillai, S., and D. Baltimore. 1987. Formation of disulphide-linked mu 2 omega 2 tetramers in pre-B cells by the 18K omega-immunoglobulin light chain. *Nature*. 329:172-174.
- Pongubala, J.M., D.L. Northrup, D.W. Lancki, K.L. Medina, T. Treiber, E. Bertolino, M. Thomas, R. Grosschedl, D. Allman, and H. Singh. 2008. Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nature immunology*. 9:203-215.

- Prasad, B.C., B. Ye, R. Zackhary, K. Schrader, G. Seydoux, and R.R. Reed. 1998. unc-3, a gene required for axonal guidance in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the O/E family of transcription factors. *Development*. 125:1561-1568.
- Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science*. 117:1281-1283.
- Rebel, V.I., C.L. Miller, C.J. Eaves, and P.M. Lansdorp. 1996a. The repopulation potential of fetal liver hematopoietic stem cells in mice exceeds that of their liver adult bone marrow counterparts. *Blood*. 87:3500-3507.
- Rebel, V.I., C.L. Miller, G.R. Thornbury, W.H. Dragowska, C.J. Eaves, and P.M. Lansdorp. 1996b. A comparison of long-term repopulating hematopoietic stem cells in fetal liver and adult bone marrow from the mouse. *Experimental hematology*. 24:638-648.
- Rizki, T., and R. Rizki. 1984. The cellular defense system of *Drosophila melanogaster*. In: King RC, Akai H, editors. *Insect ultrastructure*. New York: Plenum Publishing.:pp. 579-604.
- Roe, T., T.C. Reynolds, G. Yu, and P.O. Brown. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO journal*. 12:2099-2108.
- Roessler, S., I. Gyory, S. Imhof, M. Spivakov, R.R. Williams, M. Busslinger, A.G. Fisher, and R. Grosschedl. 2007. Distinct promoters mediate the regulation of Ebfl gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Molecular and cellular biology*. 27:579-594.
- Rolink, A., U. Grawunder, T.H. Winkler, H. Karasuyama, and F. Melchers. 1994a. IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *International immunology*. 6:1257-1264.
- Rolink, A., D. Haasner, S. Nishikawa, and F. Melchers. 1993a. Changes in frequencies of clonable pre B cells during life in different lymphoid organs of mice. *Blood*. 81:2290-2300.
- Rolink, A., H. Karasuyama, U. Grawunder, D. Haasner, A. Kudo, and F. Melchers. 1993b. B cell development in mice with a defective lambda 5 gene. *European journal of immunology*. 23:1284-1288.
- Rolink, A., H. Karasuyama, D. Haasner, U. Grawunder, I.L. Martensson, A. Kudo, and F. Melchers. 1994b. Two pathways of B-lymphocyte development in mouse bone marrow and the roles of surrogate L chain in this development. *Immunological reviews*. 137:185-201.
- Rolink, A., E. ten Boekel, F. Melchers, D.T. Fearon, I. Krop, and J. Andersson. 1996. A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and

- contains natural killer cell progenitors. *The Journal of experimental medicine*. 183:187-194.
- Rolink, A.G., T. Brocker, H. Bluethmann, M.H. Kosco-Vilbois, J. Andersson, and F. Melchers. 1999. Mutations affecting either generation or survival of cells influence the pool size of mature B cells. *Immunity*. 10:619-628.
- Rubin, H., and H.M. Temin. 1959. A radiological study of cell-virus interaction in the Rous sarcoma. *Virology*. 7:75-91.
- Rumfelt, L.L., Y. Zhou, B.M. Rowley, S.A. Shinton, and R.R. Hardy. 2006. Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *The Journal of experimental medicine*. 203:675-687.
- Russell, S.M., J.A. Johnston, M. Noguchi, M. Kawamura, C.M. Bacon, M. Friedmann, M. Berg, D.W. McVicar, B.A. Witthuhn, O. Silvennoinen, and et al. 1994. Interaction of IL-2R beta and gamma c chains with Jak1 and Jak3: implications for XSCID and XCID. *Science*. 266:1042-1045.
- Russo, J., S. Dupas, F. Frey, Y. Carton, and M. Brehelin. 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (Leptopilina boulardi) eggs in resistant and susceptible strains of Drosophila. *Parasitology*. 112 (Pt 1):135-142.
- Sakaguchi, N., and F. Melchers. 1986. Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature*. 324:579-582.
- Sambrook, J., and D.W. Russel. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Scheffé, H. 1999. The Analysis of Variance. *New York: Wiley*.
- Schlessinger, J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 103:211-225.
- Schwabe, J.W., and A. Klug. 1994. Zinc mining for protein domains. *Nature structural biology*. 1:345-349.
- Scott, E.W., R.C. Fisher, M.C. Olson, E.W. Kehrli, M.C. Simon, and H. Singh. 1997. PU.1 functions in a cell-autonomous manner to control the differentiation of multipotential lymphoid-myeloid progenitors. *Immunity*. 6:437-447.
- Scott, E.W., M.C. Simon, J. Anastasi, and H. Singh. 1994. Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. 265:1573-1577.
- Seet, C.S., R.L. Brumbaugh, and B.L. Kee. 2004. Early B cell factor promotes B lymphopoiesis with reduced interleukin 7 responsiveness in the absence of E2A. *The Journal of experimental medicine*. 199:1689-1700.

- Shen, C.P., and T. Kadesch. 1995. B-cell-specific DNA binding by an E47 homodimer. *Molecular and cellular biology*. 15:4518-4524.
- Sherman, N.E., and M. Kinter. 2000. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. *New York: John Wiley*.
- Shi, S., H.C. Calhoun, F. Xia, J. Li, L. Le, and W.X. Li. 2006. JAK signaling globally counteracts heterochromatic gene silencing. *Nature genetics*. 38:1071-1076.
- Shimizu, T., C. Mundt, S. Licence, F. Melchers, and I.L. Martensson. 2002. VpreB1/VpreB2/lambda 5 triple-deficient mice show impaired B cell development but functional allelic exclusion of the IgH locus. *Journal of immunology*. 168:6286-6293.
- Shivdasani, R.A., and S.H. Orkin. 1996. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood*. 87:4025-4039.
- Shrestha, R., and E. Gateff. 1982. Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Growth Differ.* 24: 65-82.
- Siden, E.J., D. Baltimore, D. Clark, and N.E. Rosenberg. 1979. Immunoglobulin synthesis by lymphoid cells transformed in vitro by Abelson murine leukemia virus. *Cell*. 16:389-396.
- Sigvardsson, M., D.R. Clark, D. Fitzsimmons, M. Doyle, P. Akerblad, T. Breslin, S. Bilke, R. Li, C. Yeaman, G. Zhang, and J. Hagman. 2002. Early B-cell factor, E2A, and Pax-5 cooperate to activate the early B cell-specific mb-1 promoter. *Molecular and cellular biology*. 22:8539-8551.
- Sigvardsson, M., M. O'Riordan, and R. Grosschedl. 1997. EBF and E47 collaborate to induce expression of the endogenous immunoglobulin surrogate light chain genes. *Immunity*. 7:25-36.
- Singh, H., K.L. Medina, and J.M. Pongubala. 2005. Contingent gene regulatory networks and B cell fate specification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:4949-4953.
- Singh, H., J.M. Pongubala, and K.L. Medina. 2007. Gene regulatory networks that orchestrate the development of B lymphocyte precursors. *Advances in experimental medicine and biology*. 596:57-62.
- Sitnicka, E., C. Brakebusch, I.L. Martensson, M. Svensson, W.W. Agace, M. Sigvardsson, N. Buza-Vidas, D. Bryder, C.M. Cilio, H. Ahlenius, E. Maraskovsky, J.J. Peschon, and S.E. Jacobsen. 2003. Complementary signaling through flt3 and interleukin-7 receptor

- alpha is indispensable for fetal and adult B cell genesis. *The Journal of experimental medicine*. 198:1495-1506.
- Sloan, S.R., C.P. Shen, R. McCarrick-Walmsley, and T. Kadesch. 1996. Phosphorylation of E47 as a potential determinant of B-cell-specific activity. *Molecular and cellular biology*. 16:6900-6908.
- Smith, E.M., P. Akerblad, T. Kadesch, H. Axelson, and M. Sigvardsson. 2005. Inhibition of EBF function by active Notch signaling reveals a novel regulatory pathway in early B-cell development. *Blood*. 106:1995-2001.
- Smith, E.M., R. Gisler, and M. Sigvardsson. 2002. Cloning and characterization of a promoter flanking the early B cell factor (EBF) gene indicates roles for E-proteins and autoregulation in the control of EBF expression. *Journal of immunology*. 169:261-270.
- Soper, D.S. 2011. Analysis of Variance (ANOVA) Calculator - One-Way ANOVA from Summary Data (Online Software). <http://www.danielsoper.com/statcalc3>.
- Souabni, A., C. Cobaleda, M. Schebesta, and M. Busslinger. 2002. Pax5 promotes B lymphopoiesis and blocks T cell development by repressing Notch1. *Immunity*. 17:781-793.
- Souffi, B., F. Gnad, P.R. Jensen, D. Petranovic, M. Mann, I. Mijakovic, and B. Macek. 2008. The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of Lactococcus lactis IL1403 reveals multiply phosphorylated proteins. *Proteomics*. 8:3486-3493.
- Spangrude, G.J., S. Heimfeld, and I.L. Weissman. 1988. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241:58-62.
- Sugamura, K., H. Asao, M. Kondo, N. Tanaka, N. Ishii, M. Nakamura, and T. Takeshita. 1995. The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. *Advances in immunology*. 59:225-277.
- Thal, M.A., T.L. Carvalho, T. He, H.G. Kim, H. Gao, J. Hagman, and C.A. Klug. 2009. Ebfl-mediated down-regulation of Id2 and Id3 is essential for specification of the B cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:552-557.
- Tonegawa, S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. 302:575-581.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76:4350-4354.

- Travis, A., J. Hagman, L. Hwang, and R. Grosschedl. 1993. Purification of early-B-cell factor and characterization of its DNA-binding specificity. *Molecular and cellular biology*. 13:3392-3400.
- Treiber, N., T. Treiber, G. Zocher, and R. Grosschedl. 2010a. Structure of an Ebf1:DNA complex reveals unusual DNA recognition and structural homology with Rel proteins. *Genes & development*. 24:2270-2275.
- Treiber, T., E.M. Mandel, S. Pott, I. Gyory, S. Firner, E.T. Liu, and R. Grosschedl. 2010b. Early B cell factor 1 regulates B cell gene networks by activation, repression, and transcription- independent poising of chromatin. *Immunity*. 32:714-725.
- Tsai, R.Y., and R.R. Reed. 1997. Cloning and functional characterization of Roaz, a zinc finger protein that interacts with O/E-1 to regulate gene expression: implications for olfactory neuronal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 17:4159-4169.
- Tsapogas, P., S. Zandi, J. Ahsberg, J. Zetterblad, E. Welinder, J.I. Jonsson, R. Mansson, H. Qian, and M. Sigvardsson. 2011. IL-7 mediates Ebf-1-dependent lineage restriction in early lymphoid progenitors. *Blood*. 118:1283-1290.
- Tsubata, T., and M. Reth. 1990. The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *The Journal of experimental medicine*. 172:973-976.
- Uckun, F.M., I. Dibirdik, S. Qazi, A. Vassilev, H. Ma, C. Mao, A. Benyumov, and K.H. Emami. 2007. Anti-breast cancer activity of LFM-A13, a potent inhibitor of Polo-like kinase (PLK). *Bioorganic & medicinal chemistry*. 15:800-814.
- Urbanek, P., Z.Q. Wang, I. Fetka, E.F. Wagner, and M. Busslinger. 1994. Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell*. 79:901-912.
- van der Plas, D.C., F. Smiers, K. Pouwels, L.H. Hoefsloot, B. Lowenberg, and I.P. Touw. 1996. Interleukin-7 signaling in human B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells and murine BAF3 cells involves activation of STAT1 and STAT5 mediated via the interleukin-7 receptor alpha chain. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 10:1317-1325.
- Varmus, H.E., T. Padgett, S. Heasley, G. Simon, and J.M. Bishop. 1977. Cellular functions are required for the synthesis and integration of avian sarcoma virus-specific DNA. *Cell*. 11:307-319.

- Vassilev, A., Z. Ozer, C. Navara, S. Mahajan, and F.M. Uckun. 1999. Bruton's tyrosine kinase as an inhibitor of the Fas/CD95 death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry.* 274:1646-1656.
- Venter, J.C., M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, M. Yandell, C.A. Evans, R.A. Holt, J.D. Gocayne, P. Amanatides, R.M. Ballew, D.H. Huson, J.R. Wortman, Q. Zhang, C.D. Kodira, X.H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P.D. Thomas, J. Zhang, G.L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A.G. Clark, J. Nadeau, V.A. McKusick, N. Zinder, A.J. Levine, R.J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A.E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T.J. Heiman, M.E. Higgins, R.R. Ji, Z. Ke, K.A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G.V. Merkulov, N. Milshina, H.M. Moore, A.K. Naik, V.A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D.B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science.* 291:1304-1351.
- Villen, J., S.A. Beausoleil, S.A. Gerber, and S.P. Gygi. 2007. Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104:1488-1493.
- Vinson, C.R., and K.C. Garcia. 1992. Molecular model for DNA recognition by the family of basic-helix-loop-helix-zipper proteins. *The New biologist.* 4:396-403.
- von Freeden-Jeffry, U., P. Vieira, L.A. Lucian, T. McNeil, S.E. Burdach, and R. Murray. 1995. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *The Journal of experimental medicine.* 181:1519-1526.
- Walsh, C. 2006. Posttranslational modification of proteins: Expanding nature's inventory. *Englewood, Colo.: Roberts and Co. Publishers.* xxi.
- Wang, M.M., and R.R. Reed. 1993. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature.* 364:121-126.
- Wang, S.S., A.G. Betz, and R.R. Reed. 2002. Cloning of a novel Olf-1/EBF-like gene, O/E-4, by degenerate oligo-based direct selection. *Molecular and cellular neurosciences.* 20:404-414.

- Wang, S.S., J.W. Lewcock, P. Feinstein, P. Mombaerts, and R.R. Reed. 2004. Genetic disruptions of O/E2 and O/E3 genes reveal involvement in olfactory receptor neuron projection. *Development*. 131:1377-1388.
- Wang, S.S., R.Y. Tsai, and R.R. Reed. 1997. The characterization of the Olf-1/EBF-like HLH transcription factor family: implications in olfactory gene regulation and neuronal development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 17:4149-4158.
- Warner, N.L., M.A. Moore, and D. Metcalf. 1969. A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *Journal of the National Cancer Institute*. 43:963-982.
- Weinmaster, G., M.J. Zoller, M. Smith, E. Hinze, and T. Pawson. 1984. Mutagenesis of Fujinami sarcoma virus: evidence that tyrosine phosphorylation of P130gag-fps modulates its biological activity. *Cell*. 37:559-568.
- Wernig, G., M.G. Kharas, R. Okabe, S.A. Moore, D.S. Leeman, D.E. Cullen, M. Gozo, E.P. McDowell, R.L. Levine, J. Doukas, C.C. Mak, G. Noronha, M. Martin, Y.D. Ko, B.H. Lee, R.M. Soll, A. Tefferi, J.D. Hood, and D.G. Gilliland. 2008. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer cell*. 13:311-320.
- Whitlock, C.A., and O.N. Witte. 1982. Long-term culture of B lymphocytes and their precursors from murine bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79:3608-3612.
- Winkler, T.H., A. Rolink, F. Melchers, and H. Karasuyama. 1995. Precursor B cells of mouse bone marrow express two different complexes with the surrogate light chain on the surface. *European journal of immunology*. 25:446-450.
- Winston, L.A., and T. Hunter. 1995. JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *The Journal of biological chemistry*. 270:30837-30840.
- Withuhn, B.A., O. Silvennoinen, O. Miura, K.S. Lai, C. Cwik, E.T. Liu, and J.N. Ihle. 1994. Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature*. 370:153-157.
- Xue, Y., F. Zhou, M. Zhu, K. Ahmed, G. Chen, and X. Yao. 2005. GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic acids research*. 33:W184-187.

- Yaffe, M.B., and L.C. Cantley. 1999. Signal transduction. Grabbing phosphoproteins. *Nature*. 402:30-31.
- Yin, M., S. Liu, Y. Yin, S. Li, Z. Li, X. Wu, B. Zhang, S.L. Ang, Y. Ding, and J. Zhou. 2009. Ventral mesencephalon-enriched genes that regulate the development of dopaminergic neurons in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29:5170-5182.
- Yoder, M.C., K. Hiatt, and P. Mukherjee. 1997. In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:6776-6780.
- Yokota, T., T. Kouro, J. Hirose, H. Igarashi, K.P. Garrett, S.C. Gregory, N. Sakaguchi, J.J. Owen, and P.W. Kincade. 2003. Unique properties of fetal lymphoid progenitors identified according to RAG1 gene expression. *Immunity*. 19:365-375.
- Yoshida, T., S.Y. Ng, J.C. Zuniga-Pflucker, and K. Georgopoulos. 2006. Early hematopoietic lineage restrictions directed by Ikaros. *Nature immunology*. 7:382-391.
- Young, F., E. Mizoguchi, A.K. Bhan, and F.W. Alt. 1997. Constitutive Bcl-2 expression during immunoglobulin heavy chain-promoted B cell differentiation expands novel precursor B cells. *Immunity*. 6:23-33.
- Zandi, S., R. Mansson, P. Tsapogas, J. Zetterblad, D. Bryder, and M. Sigvardsson. 2008. EBF1 is essential for B-lineage priming and establishment of a transcription factor network in common lymphoid progenitors. *Journal of immunology*. 181:3364-3372.
- Zardo, G., M.I. Tiirikainen, C. Hong, A. Misra, B.G. Feuerstein, S. Volik, C.C. Collins, K.R. Lamborn, A. Bollen, D. Pinkel, D.G. Albertson, and J.F. Costello. 2002. Integrated genomic and epigenomic analyses pinpoint biallelic gene inactivation in tumors. *Nature genetics*. 32:453-458.
- Zhang, Z., C.V. Cotta, R.P. Stephan, C.G. deGuzman, and C.A. Klug. 2003. Enforced expression of EBF in hematopoietic stem cells restricts lymphopoiesis to the B cell lineage. *The EMBO journal*. 22:4759-4769.
- Zhao, L.Y., Y. Niu, A. Santiago, J. Liu, S.H. Albert, K.D. Robertson, and D. Liao. 2006. An EBF3-mediated transcriptional program that induces cell cycle arrest and apoptosis. *Cancer research*. 66:9445-9452.
- Zhou, F.F., Y. Xue, G.L. Chen, and X. Yao. 2004. GPS: a novel group-based phosphorylation predicting and scoring method. *Biochemical and biophysical research communications*. 325:1443-1448.

Referenzen

- Zhuang, Y., A. Jackson, L. Pan, K. Shen, and M. Dai. 2004. Regulation of E2A gene expression in B-lymphocyte development. *Molecular immunology*. 40:1165-1177.
- Zhuang, Y., P. Soriano, and H. Weintraub. 1994. The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell*. 79:875-884.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Matthias Kieslinger möchte ich für die Bereitstellung dieses interessanten und vielseitigen Themas, für seine Betreuung während der Anfertigung dieser Dissertation und insbesondere für die Unterstützung in den letzten Wochen herzlich danken.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Daniel Krappmann für die Betreuung dieser Arbeit als Erstgutachter und die stets konstruktiven Anregungen während der letzten drei Jahre. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Elisabeth Weiß für die Anfertigung des Zweitgutachtens sowie bei Prof. Dr. Angelika Böttger, Prof. Dr. Heinrich Jung, Prof. Dr. Bettina Kempkes und Prof. Dr. Barbara Conradt für die Übernahme der Begutachtung herzlich bedanken.

Auch unseren Kooperationspartnern möchte ich danken: Dr. Hakan Sarioglu für die Durchführung der Massenspektrometrie, Dr. Elisabeth Kremmer und ihrer Arbeitsgruppe für die Herstellung phosphospezifischer Antikörper, Prof. Dr. Wilfried Ellmeier für die Bereitstellung *Btk*-defizienter Zellen und Prof. Dr. Veronika Sexl für die Bereitstellung des Jak-Inhibitors.

Zu großem Dank bin ich auch Volker Groß für seine großartige Hilfsbereitschaft bei der Injektion von Mäusen verpflichtet.

Auch den Tierpflegern Martina, Michael, Franzi, Dani, Silke, Sabine, Jasmin und Albert möchte ich herzlich für die Betreuung meiner Mausstämme sowie ihre tägliche Hilfsbereitschaft danken.

Ein großer Dank gilt Dr. Gerald Burgstaller, der mit seiner hervorragenden Arbeit die Grundlage für dieses interessante Projekt geschaffen und fachlich wie persönlich eine große Lücke im Labor hinterlassen hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Arbeitskollegen und Freunden Silvia Hiechinger, Christoph Hinzen und Bettina Groll: Silvi, meiner einzige wahren Laborpartnerin im Igel-Labor, die mir besonders in der Anfangszeit stets fachlich und freundschaftlich zur Seite

Danksagung

stand; Chris, meinem Lieblings-Bedenkenträger, -Kritiker und -Zellenversorger; und Tina für ihre unermüdliche Unterstützung in “wo-muss-ich-hier-hinklicken”-Fragen, aber vor allem dafür, dass sie immer für mich da ist. Schön, dass dank uns nun Sendling und Laim durch eine Fan-Freundschaft verbunden sind.

Gemeinsam haben wir es nun doch geschafft!

Des Weiteren möchte ich meinen derzeitigen und früheren Kollegen Torsten Willert, Saihong Jin und vor allem Petra Kopp für ihre fachliche Unterstützung und die schönen Momente im Labor danken.

Von allen Kollegen gilt mein größter Dank jedoch Dir, Katharina “Feldwebel” Zettl, Traum-TA und beste Freundin zugleich, für Deine tägliche Unterstützung im Job sowie im Privaten, für gemeinsames GFP-Messen, Ingwer-Tees und all die vielen lustigen und schönen Tage der letzten drei Jahre! Solch eine Freundschaft findet man nur selten.

Sehr herzlich danke ich auch Petra Fiedler für ihre Freundschaft sowie ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere während der letzten Wochen.

Des Weiteren möchte ich den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Bornkamm, Laux, Strobl, Jungnickel und Mautner für die fachliche Unterstützung und netten Unterhaltungen zwischendurch danken.

Vor allem möchte ich mich noch einmal bei Petra Kopp, Mani, Benni und Tini bedanken! Ihr wisst wofür.

Ganz herzlich bedanke ich mich auch bei Mirko Theine, der mich - in guten wie in schlechten Tagen - über viele Jahre hinweg so großartig unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre Unterstützung in all den Jahren. Ein Dankeschön, das nicht groß genug sein kann, geht jedoch an meine Mutter, die in allen Lebenslagen stets für mich da ist und mir zur Seite steht. Ich könnte mir keine bessere wünschen!

Und last but never least danke ich meinen besten Freunden Stephanie Vogel, Benjamin Möller, Manija Ghulam und Marco Schneuer. Auch wenn Ihr weit weg seid, seid Ihr doch immer da!

Lebenslauf

Inga Ludenberg

geboren am 24.04.1983 in Hamburg

Staatsangehörigkeit

deutsch

Wissenschaftlicher Werdegang

seit Juni 2008

Promotion am Helmholtz Zentrum München, Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumogenetik, zum Thema „Regulation der B-Zell-Differenzierung anhand posttranslationaler Modifikationen von Ebf1 und Untersuchungen zur Redundanz von Ebf-Proteinen“

Mai 2007 - Januar 2008

Diplomarbeit am Biozentrum Klein Flottbek, Universität Hamburg, zum Thema „Molekulare und zellbiologische Untersuchungen zum Glycoprotein p2 und der Morphologie des *European mountain ash ringspot-associated virus* (EMARAV)“

Oktober 2002 - Januar 2008

Studium der Biologie an der Universität Hamburg

Schulischer Bildungsweg

2002

Abitur am Johannes-Brahms-Gymnasium, Pinneberg

1989-1993

Hans-Claussen-Grundschule, Pinneberg

Poster:

9th B Cell Forum of the German Society of Immunology of the Study Group „Biology of B Lymphocytes“, Bad Sooden-Allendorf, Deutschland, 2011

Inga Ludenberg, Bettina Groll und Matthias Kieslinger

Titel: „Redundancy of Ebf proteins in B cell development?“

Manuskripte in Vorbereitung:

Inga Ludenberg, Gerald Burgstaller, Hakan Sarioglu, Bettina Groll, Katharina Zettl, Volker Groiß and Matthias Kieslinger

„B cell development is regulated by posttranslational modifications of Ebfl“

Inga Ludenberg*, Bettina Groll*, Katharina Zettl and Matthias Kieslinger

„Shedding light on the putative redundancy of Ebf proteins“

* equal contribution

Bettina Groll, Gerald Burgstaller, Saihong Jin, Petra Kopp, **Inga Ludenberg**, Tanja Klein-Rodewald, Irene Esposito, Matias Mosqueira, Moritz Förderer, Tihomir Georgiev, Cornelia Weber, Rainer Fink, Mario Garcia-Dominguez, Patrick Charnay and Matthias Kieslinger

„Ebf3 participates in transcriptional control of murine muscle development and influences diaphragm function by regulating *Atp2a1*“

Diese Dissertation wurde von Juni 2008 bis November 2011 am Helmholtz Zentrum München im Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik angefertigt.

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den 30. November 2011

.....
Inga Ludenberg

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist und dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

München, den 30. November 2011

.....
Inga Ludenberg